

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Biologie

Genetika, molekulární biologie a virologie



Bc. Markéta Šafaříková

**Genetické faktory ovlivňující průběh vybraných forem
nefrotického syndromu**

**Genetic factors affecting course of selected forms of nephrotic
syndrome**

Diplomová práce

Školitel: Ing. Jitka Štekrová

Praha 2011

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze 15.7. 2011

Na tomto místě bych ráda poděkovala mé školitelce Ing. Jitce Štekrové za její skvělé vedení diplomové práce, Doc.MUDr. Janě Reiterové, Ph.D. za její neocenitelné rady a Ing. Věře Kebrdlové, Michaelle Krylové, Martině Řezníkové a Monice Škodové za jejich technickou pomoc a podporu.

Práce vznikala v letech 2010 – 2011 jako součást grantového projektu IGA MZČR č. NS9779-4: Genetické faktory ovlivňující průběh vybraných forem nefrotického syndromu

ABSTRAKT

Mezi hlavní znaky nefrotického syndromu (NS) patří nefrotická proteinurie, hypalbuminémie, hypercholesterolémie a otoky. NS se vyskytuje u primárních i sekundárních glomerulopatií a může být rozdělen na dvě hlavní skupiny: primární (idiopatická) a sekundární. Dědičnost nefrotického syndromu je autozomálně dominantní i autozomálně recesivní. K nejvýznamnějším genům, jejichž mutace podmiňují vznik dědičné formy nefrotického syndromu u dospělých pacientů, patří *ACTN4*, *CD2AP*, *NPHS2* a *TRPC6*.

Gen *ACTN4*, který kóduje protein α -aktinin 4, je zodpovědný za autozomálně dominantní formu fokální segmentální glomerulosklerózy FSGS, která patří mezi primární glomerulopatie. α -Aktinin 4 je také zmiňován v souvislosti s různými druhy karcinomů.

Náplní diplomové práce je mutační analýza genu *ACTN4* na souboru 48 pacientů s nefrotickým syndromem. Mutační analýza byla provedena pomocí techniky high resolution melting (HRM) a sekvenace vybraných vzorků. V rámci diplomového projektu bylo nalezeno několik popsanych i nepopsanych SNPs. Nalezena byla také jedna bodová záměna s pravděpodobným kauzálním významem pro FSGS.

KLÍČOVÁ SLOVA

ACTN4, α -aktinin 4, fokální segmentální glomeruloskleróza, glomerulus, high resolution melting, mutační analýza, nefrotický syndrom, podocyt, SNP

ABSTRACT

Nephrotic syndrome (NS) is characterized by proteinuria, hypalbuminemia and edemas. It occurs during first and second glomerulopathies. This disease can be divided into two groups: primary (idiopathic) and secondary. The heredity of the familial nephrotic syndrome is autosomal dominant and autosomal recessive. There are four most important genes that condition the formation of hereditary nephrotic syndrome in adult patient. These genes are *ACTN4*, *CD2AP*, *NPHS2* and *TRPC6*.

The gene *ACTN4*, which encodes protein α -actinin 4, is responsible for the autosomal dominant form of focal segmental glomerulosclerosis (FSGS). FSGS is included in first glomerulopathies. α -Actinin 4 was also researched for some types of carcinomas.

There was performed the mutational analysis of the gene *ACTN4* on the set of 48 patients with nephrotic syndrome in this diploma thesis. High resolution melting (HRM) analysis and sequencing selected samples were used during this mutation detection. During this process many published and unpublished SNPs and one unpublished candidate mutation that could have causal associations with FSGS were found.

KEY WORDS

ACTN4, α -actinin 4, focal segmental glomerulosclerosis, glomerulus, high resolution melting, mutation analysis, nephrotic syndrome, podocyte, SNP

OBSAH

ABSTRAKT	4
KLÍČOVÁ SLOVA	4
ABSTRACT	5
KEY WORDS	5
OBSAH	6
SEZNAM ZKRATEK	8
1 ÚVOD	11
2 PŘEHLED LITERATURY	12
2.1 STRUKTURA A FUNKCE LEDVIN	12
2.2 NEFROTICKÝ SYNDROM	14
2.3 FOKÁLNÍ SEGMENTÁLNÍ GLOMERULOSKLERÓZA.....	15
2.4 A-AKTININ	21
2.5 A-AKTININ 4.....	25
3 MATERIÁL	29
3.1 DNA PACIENTŮ S NEFROTICKÝM SYNDROMEM	29
3.2 DNA ZDRAVÝCH OSOB	30
3.3 DNA PŘÍBUZNÝCH NĚKTERÝCH PACIENTŮ	31
3.4 PRIMERY.....	31
4 METODY	32
4.1 HIGH RESOLUTION MELTING.....	32
4.2 POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE.....	36
4.3 HORIZONTÁLNÍ AGARÓZOVÁ ELEKTROFORÉZA.....	38
4.4 KOLONKOVÉ ČIŠTĚNÍ PO PCR REAKCI	40
4.5 SEKVENAČNÍ REAKCE A SEKVENACE.....	40
4.6 ETANOLOVÉ ČIŠTĚNÍ PO SEKVENAČNÍ REAKCI	42
4.7 KOLONKOVÉ ČIŠTĚNÍ PO SEKVENAČNÍ REAKCI	43
4.8 POUŽITÉ PROGRAMY A DATABÁZE	43
5 VÝSLEDKY	44
5.1 NALEZENÉ POPSANÉ EXONOVÉ JEDNOBODOVÉ POLYMORFIZMY V GENU <i>ACTN4</i>	44
5.2 NALEZENÉ INTRONOVÉ JEDNOBODOVÉ POLYMORFIZMY V GENU <i>ACTN4</i>	48

5.3	NALEZENÉ NEPOPSANÉ EXONOVÉ JEDNOBODOVÉ POLYMORFIZMY V GENU <i>ACTN4</i> NEMĚNÍCÍ AMINOKYSELINOVÉ SLOŽENÍ.....	50
5.4	NALEZENÉ NEPOPSANÉ EXONOVÉ JEDNOBODOVÉ ZÁMĚNY V GENU <i>ACTN4</i> MĚNÍCÍ AMINOKYSELINOVÉ SLOŽENÍ.....	52
6	DISKUZE	57
7	SOUHRN	61
8	SEZNAM LITERATURY	63

SEZNAM ZKRATEK

ABD - aktin vázající doména

ACTN4 - gen kódující protein α -aktinin 4

AD - autozomálně dominantní

AK - aminokyselina

Ang II - angiotenzin II

AR - autozomálně recesivní

BERP - brain expressed RING finger protein

bp - base pair

BP180 - protein přítomný v hemidezmozomech

CaMKII - Ca^{2+} / calmodulin dependent protein kinase II

CD2AP - gen kódující CD2 asociující protein

CELL - cellular

CLP-36 - protein spojovaný s aktinovými kontraktilními vlákny

COLL - collapsing

CRM-1 - chromosome region maintenance, receptor pro jaderný export

CRRB - Český registr renálních biopsií

dATP - deoxyadenosintrifosfát

dCTP - deoxycytidintrifosfát

dGTP - deoxyguanosintrifosfát

dNTP - deoxynukleotidtrifosfát

dTTP - deoxytymidintrifosfát

ddNTP - dideoxynukleotidtrifosfát

DMSO - dimetyl sulfoxid

DNA - deoxyribonukleová kyselina

dsDNA - double strand DNA, dvouřetězcová molekula DNA

E3KARP - regulační protein

EDTA - etylendiamintetraoctová kyselina

EGF - epidermální růstový faktor

ET-1 - epitelin 1

EtBr - ethidium bromid

EtOH - etanol

FAK - focal adhesion kinase

F-aktin - filámentární aktin
FN - fakultní nemocnice
FSGS - fokální segmentální glomeruloskleróza
GAP - GTPase activating protein
GBM - glomerulární bazální membrána
GLUT4 - glucose transporter type 4
HIV - human immunodeficiency virus, virus lidské imunodeficiency
HRM - high resolution melting
CH - kalponin homologní doména
IgA - imunoglobulin A
INF2 - gen kódující inverted formin 2
INO 80 - chromozom remodelující komplex
iNOS - inducible nitric oxide synthase
INS - idiopatický nefrotický syndrom
MAGI-1 - membrane-associated guanylate kinase
MCN - minimální změny glomerulů
MGN - membranózní glomerulonefritida
MCP-1 - monocyte chemoattractant protein 1
NCBI - National Center for Biotechnology Information
NPHS1 - gen kódující protein nefrin
NPHS2 - gen kódující protein podocin
NHE3 - Na⁺ / H⁺ exchanger 3
NOS - not otherwise specified
NS - nefrotický syndrom
ORF - otevřený čtecí rámec
PAI-1 - plasminogen activator inhibitor type 1
PCR - polymerázová řetězová reakce
PDGF - platelet-derived growth factor
PEC - parietální epiteliální buňka
PH - perihilar
PLCE1 - gen kódující protein fosfolipáza C epsilon 1
primer F - přímý primer
primer R - zpětný primer

R - spektrínová repetice
RN-tre - Rab5 specifický GAP protein
rpm - revolution per minut, v českém překladu otáček za minutu
rRNA - ribozomální ribonukleová kyselina
SNP - single nucleotide polymorphism, jednobodový polymorfizmus
ssDNA - single strand DNA
TBM - tubulární bazální membrána
TBE - tris/borát/EDTA
TRPC6 – transient receptor potential channel, skupina C, člen 6
UBF - upstream binding factor
UV - ultraviolet, ultrafialový
VFN - Všeobecná fakultní nemocnice
WT-1 - protein Wilms tumor 1
ZO-1 - zonula occludens-1

1 ÚVOD

Nefrotickým syndromem (NS) se projevuje řada onemocnění v nefrologii. Je způsoben zvýšenou propustností kapilární stěny glomerulu pro makromolekuly. Mezi jeho hlavní znaky patří nefrotická proteinurie (přítomnost bílkoviny v moči), hypalbuminémie (snížená koncentrace albuminu v krvi), hypercholesterolémie (zvýšená hladina cholesterolu v krvi) a otoky postihující horní i dolní končetiny, záda a oční víčka. Tyto otoky mohou vést až k tzv. anaserce, což je otok celého těla. NS se vyskytuje u primárních i sekundárních glomerulopatií. Mezi primární glomerulopatie patří fokální segmentální glomeruloskleróza, membranózní glomerulonefritida a minimální změny glomerulů. Do sekundárních glomerulopatií se řadí např. amyloidóza ledvin a lupusová nefritida. Dědičnost u familiárního NS je autozomálně dominantní (AD) i autozomálně recesivní (AR). Nefrotický syndrom s genetickým podkladem se vyskytuje převážně u dětí, avšak se může objevit i v dospělém věku. K nejvýznamnějším genům, jejichž mutace podmiňují vznik dědičné formy nefrotického syndromu u dospělých pacientů, patří *ACTN4*, *CD2AP*, *NPHS2* a *TRPC6*.

Náplní diplomové práce je mutační analýza genu *ACTN4*, který kóduje protein α -aktinin 4. Tento gen je zodpovědný za autozomálně dominantní formu fokální segmentální glomerulosklerózy. Analýza DNA byla provedena na souboru 48 pacientů postižených nefrotickým syndromem. K záchytu mutací a polymorfizmů byla použita technika high resolution melting. Zachycené vzorky byly následně sekvenovány a vyhodnoceny podle referenční sekvence genu *ACTN4*.

Cílem diplomového projektu bylo objevení nových a nepopsaných polymorfizmů, kauzálních mutací a jiných změn, které by mohly vést k nefrotickému syndromu.

Objevení nové kauzální mutace nebo změny by bylo možno v budoucnosti využít při diagnostice pacientů s nefrotickým syndromem.

2 PŘEHLED LITERATURY

2.1 STRUKTURA A FUNKCE LEDVIN

Ledviny jsou párový orgán fazolovitého tvaru o délce 10 – 12 cm a hmotnosti 135 – 150 g. Nachází se po obou stranách páteře v dutině břišní. V dospělosti jsou zavěšeny mezi úrovní dvanáctého žebra a třetího bederního obratle. Jsou obklopeny zádonými svaly a uloženy v tukovém pouzdře, které je chrání před chladem a mechanickým poškozením. Povrch je u dospělého člověka hladký s červenohnědým zabarvením. Avšak u novorozence je povrch laločnatý.

Při průřezu je parenchym ledvin dělen na 2 jasně odlišitelné části – kůra (*cortex*) a dřev (medulla), která se dále dělí na zevní část se zevním a vnitřním proužkem a vnitřní část.

Prívod krve do ledvin zajišťuje *arteria renalis* (renální tepna) větvcí se na dorzální a ventrální část. Dalším větvením vznikají *arteriae lobares* a následně *interlobares* jdoucí dřev ke kůře. V hraniční oblasti kůry a dřev se větví na *arteriae arcuatae*, ze kterých se větví *arteriae interlobulares* dávající vznik *arteriolae glomerulares afferentes* (*vasa afferentia*). *Vasa afferentia* přechází prostřednictvím preferenčních kanálů v *arteriolae glomerulares efferentes* (*vasa efferentia*). Ty následně tvoří peritubulární kapilární pletě také nazývanou nízkotlaká síť. Žilní krev se odvádí pomocí *venulae stellatae*, které dávají vznik *venae interlobulares*. Ty se sbíhají do *venae arcuatae*, *venae interlobares* a *venae lobares*. *Venae lobares* ústí do *vena renalis* (renální žíla).

Z *vasa efferentia* juxtamediórních nefronů odstupují *arteriole rectae* (*vasa recta*), které zásobují krví dřev ledvin. Krev ze dřev je odváděna pomocí *venulae rectae*, které ústí do *venae arcuatae*.

Základními funkčními jednotkami ledvin jsou nefrony, které je možno rozdělit dle polohy na 3 druhy. Superficiální nefron ležící při povrchu kůry a intermediární a juxtamediórní nefrony, které se nachází v kůře při její hranici se dřev. V jedné ledvině zdravého člověka se nachází přibližně 1 mil. nefronů. Základem nefronu je Malpighiho neboli renální tělísko. To se skládá z Bowmanova pouzdra, glomerulu, mezangia a juxtaglomerulárního aparátu.

Glomerulus je vlastně klubíčko prívodných (*vas afferens*) a odvodných (*vas efferens*) kapilár a preferenčních kanálů. Glomerulární kapilární oběh je také nazýván

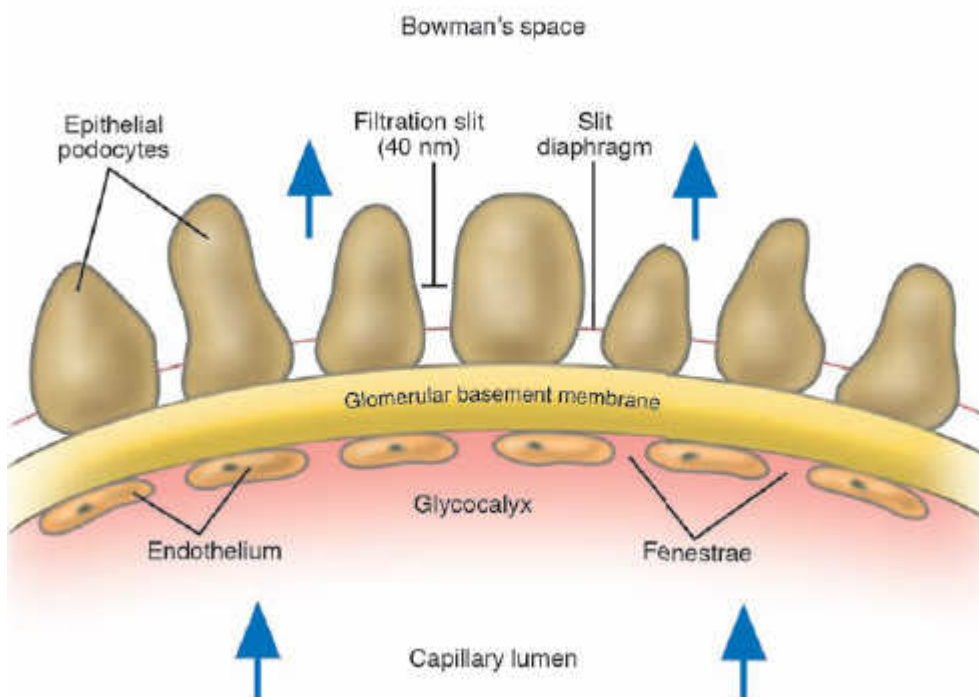
jako vysokotlaká síť. Glomerulus je obklopen Baumanovým pouzdrém tvořeným vnější a vnitřní vrstvou buněk. Ve vnitřní vrstvě se nachází podocyty, které svými pseudopodii (tzv. pedicely) obepínají bazální laminu kapilár, vnější vrstvu tvoří parietální epitelální buňky. Mezangium vyztužuje stěny kapilár a chrání je tak před vysokým tlakem v kapilárách. Juxtaglomerulární aparát je tvořen inervovanými juxtaglomerulárními buňkami nacházejícími se ve stěnách *vas afferens* při vstupu do glomerulu a buňkami *macula densa* tvořícími výstelku stěny distálního tubulu u glomerulu. Posledním typem buněk juxtaglomerulárního aparátu jsou buňky mezangia tvořící spojenci mezi výše uvedenými typy buněk.

Mezi další části nefronu patří proximální tubus, Henleova klička, distální tubulus a sběrný kanálek. Proximální tubulus navazuje na Baumanovo pouzdro a skládá se z přímé a stočené části. Na lumenální straně se nachází charakteristický kartáčový lem. Henleova klička se dělí na raménko sestupné a vzestupné s tenkou a silnou částí. Silná část vzestupného raménka bývá někdy řazena k distálnímu tubulu. V části zvané distální konvolut se nachází buňky *macula densa* a právě tímto místem se distální tubulus přichycuje ke glomerulu. Sběrný kanálek, poslední část nefronu, se skládá ze sběrného kanálku vnější dřeně a sběrného kanálku vnitřní dřeně. Větší počet sběrných kanálků tvoří renální pyramidy. Jejich konce jsou otevřené a obklopené ledvinovými kalichy, které následně ústí do ledvinové pánvičky.

Hlavní funkcí ledvin je filtrace krve a následné vylučování toxických a cizorodých látek, zplodin metabolismu a přebytečných látek, které tělo v daném okamžiku nevyužije díky jejich vysoké koncentraci. Za 1 min. proteče ledvinami přibližně 1200 – 1300 ml krve. Z toho objemu směřuje 10 % do dřeně a 90 % do kůry. Spotřeba kyslíku činí 18 ml za min. Mezi další funkce patří resorpce iontů, vody a dalších molekul (např. aminokyselin), tubulární sekrece, endokrinní činnost (např. erythropoetin, kalcitriol, renin) a zajištění homeostáze vnitřního prostředí organismu. Glomerulární filtrací krevní plazmy vzniká primární moč, jejíž objem za den činí 170 – 200 l. Svým složením se podobá krevní plazmě a obsahuje řadu látek a molekul, které musí být resorbovány. V tubulech a Henleově kličce se zpětně vstřebávají kationty (např. Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , NH_3^+), anionty (např. Cl^- , HCO_3^- , fosfáty), aminokyseliny, glukóza, voda, karboxylové kyseliny atd. Zároveň však probíhá i sekrece. Sekretovány jsou např. kationty K^+ a H^+ , léčiva, zplodiny metabolismu ve spojení s kyselinou glukoronovou a kyselinou sírovou a neurotransmitery. Sekrece i

resorpce probíhají aktivně a pasivně. Konečným produktem výše uvedených procesů je definitivní moč, které zdravý člověk vytvoří přibližně 1,5 l za den.

Filtrační bariéra má tři základní složky. Těmito složkami jsou podocyty, které se nachází pouze v glomerulech, glomerulární bazální membrána a fenestrované endotelium kapilár (viz Obr. 1). Štěrbina mezi podocyty je kryta tenkou membránou tzv. split diaphragm.



Obr. 1: Tři základní složky glomerulární filtrační bariéry. Modré šipky zobrazují směr filtrace. Převzato a upraveno z DEEN 2004.

2.2 NEFROTICKÝ SYNDROM

Nefrotický syndrom (NS) není onemocnění v klasickém smyslu, ale jedná se o soubor příznaků, mezi které patří nefrotická proteinúrie ($> 3,5 \text{ g} / 24 \text{ hod.}$), hypoproteinémie (sérový albumin $< 35 \text{ g} / \text{l}$), hyperlipidémie a otoky, jenž mohou vést k anasarce. Nefrotický syndrom se vyskytuje u primárních i sekundárních glomerulonefritid. K nejčastějším příčinám nefrotického syndromu z primárních forem patří fokální segmentální glomeruloskleróza (FSGS), membranózní glomerulonefritida (MGN) a minimální změny glomerulů (MCN), ze sekundárních forem pak amyloidóza ledvin, diabetická nefropatie a lupusová nefritida (RYŠAVÁ *et al.* 2005). Z dat

Českého registru renálních biopsií (CRRB) vyplývá, že přibližně 40 % bioptovaných pacientů trpí nefrotickou proteinurií. Z tohoto množství připadá cca 15 % na MCN, 12 % na MGN a 11 % na FSGS (RYCHLÍK *et al.* 2004). Příčiny NS se velmi liší podle věku. U dětí bývá nejčastější příčinou NS minimální změny glomerulů, avšak v dospělosti se nejvíce vyskytují membranózní glomerulonefritida a FSGS (HAAS *et al.* 1997).

Nefrotický syndrom lze rozdělit podle věku nástupu na kongenitální, juvenilní a adolescentní (TESAŘ 2008) nebo podle příčiny na primární (též nazýván idiopatický) a sekundární. U kongenitálního NS nastupují příznaky v prvních 3 měsících života dítěte. Sekundární NS je součástí jiného onemocnění (GEIER 2001). Přibližně 18 % případů idiopatického nefrotického syndromu (INS) je na základě genetického podkladu. Dědičnost je AD i AR. Do dnešní doby bylo ve spojitosti se steroid rezistentním INS popsáno 7 genů, kterými jsou *NPHS1*, *NPHS2*, *CD2AP*, *PLCE1*, *ACTN4*, *TRPC6* a *INF2* (REITEROVÁ a ŠAFRÁNKOVÁ 2010). *PLCE1* gen kóduje fosfolipázu C epsilon 1 (HINKES *et al.* 2006). *INF2* gen kóduje tzv. inverted formin 2 protein patřící do forminové rodiny. Tento protein ovlivňuje funkci aktinového cytoskeletu v podocytech. Mutace v *INF2* jsou spojovány s FSGS (BROWN *et al.* 2010, BOYER *et al.* 2011). FSGS je také vyvolána mutacemi v genu pro iontový kanál pro vápenaté kationty *TRPC6* (WINN *et al.* 2005). Dalším genem spojovaným s FSGS je *CD2AP*, který kóduje CD2 asociovaný protein. V ledvinách hraje nezastupitelnou úlohu při správné funkci slit diaphragm (SHIH *et al.* 2001, GIGANTE *et al.* 2009). S nefrotickým syndromem finského typu je spojován *NPHS1*, jehož produktem je nefrin, který se specificky nachází ve slit diaphragm podocytů (RUOTSALAINEN *et al.* 1999). V podocytech je exprimován gen *NPHS2*, který kóduje podocin a je spojován s nefrotickým syndromem rezistentním k léčbě steroidy (BOUTE *et al.* 2000). O *ACTN4* kódujícím α -aktinin 4 (KAPLAN *et al.* 2000) pojednávají kapitoly 2.5 a 2.6.

2.3 FOKÁLNÍ SEGMENTÁLNÍ GLOMERULOSKLERÓZA

Jak již plyne z názvu, jedná se o částečné (segmentální) poškození některých (fokální) glomerulů. Příčiny vzniku i histologické nálezy jsou velice pestré, a proto lze říci, že se nejedná o nemoc v pravém slova smyslu, ale spíše o popisnou diagnózu. FSGS lze rozdělit podle dvou způsobů a těmi jsou původ a histologický nález.

Podle původu dělíme FSGS na primární nazývanou též idiopatická, tedy z neznámé příčiny, a sekundární, kdy příčiny vzniku jsou velice pestré.

1. dědičná nazývaná též familiární – způsobena mutacemi v některých genech, mezi které patří např. geny pro α -aktinin 4, WT-1, podocin a β -integrin, a v mitochondriální DNA
2. FSGS asociovaná s viry – Parvovirus B19 a HIV asociovaná neuropatie
3. FSGS způsobená přítomností léčiv a drog – např. heroin, interferon- α , lithium, pamidronát
4. FSGS jako adaptivní strukturně-funkční reakce na glomerulární hypertrofii nebo hyperfiltraci
 - a) při redukci renální tkáně – např. renální dysplázie, ageneze ledviny, kortikální nefróza a ablace ledviny
 - b) při zachování objemu renální tkáně – např. obezita, hypertenze, diabetes mellitus a srpkovitá anémie

(D'AGATI 1994, 2003, D'AGATI *et al.* 2004)

V morfologickém dělení se používají systémy se 4 nebo 5 variantami, přičemž rozdíly v obou typech rozdělení jsou jen velice nepatrné.

I. systém se 4 variantami

1. klasická FSGS – zjizvení části některých glomerulů, kde kolabují kapilární kličky se zmnoženým mezangiem a částečným uzavřením díky depozice amorfní matrix a hyalinu, v postižených úsecích glomerulus často srůstá s Bowmanovým pouzdrem
2. kolabující FSGS – dominantním znakem jsou rozsáhlé kolapsy glomerulárních trsů, tento typ je typický pro HIV asociovanou FSGS
3. periferní FSGS – sklerózou postižená oblast je kolem počátku proximálního tubulu
4. buněčná FSGS – charakteristická je vyšší mezangiální buněčnost a mírné zmnožení mezangiální matrix

(TESAŘ *et al.* 2006)

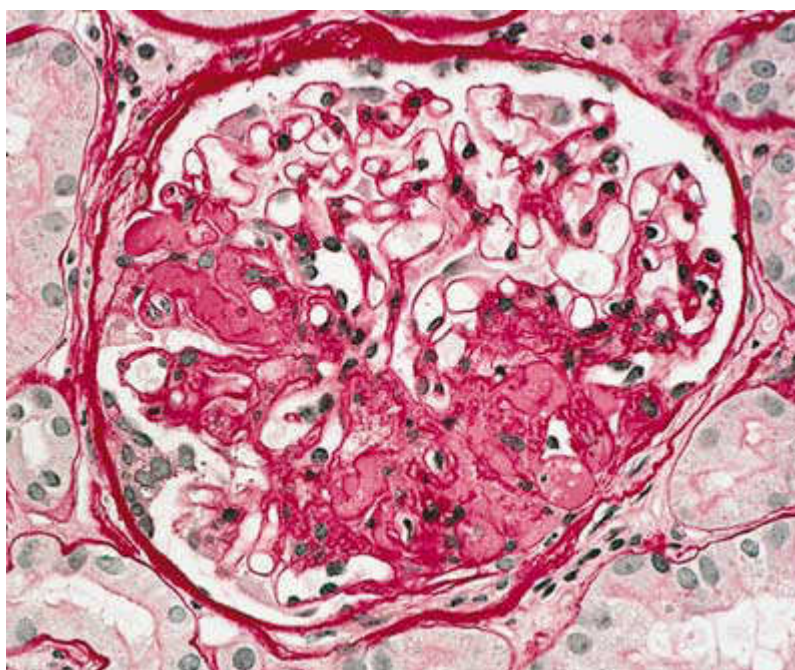
II. systém s 5 variantami

1. not otherwise specified FSGS (NOS) – charakteristickým znakem je nárůst objemu extracelulární matrix v místě postižení glomerulu, což vede ke zničení

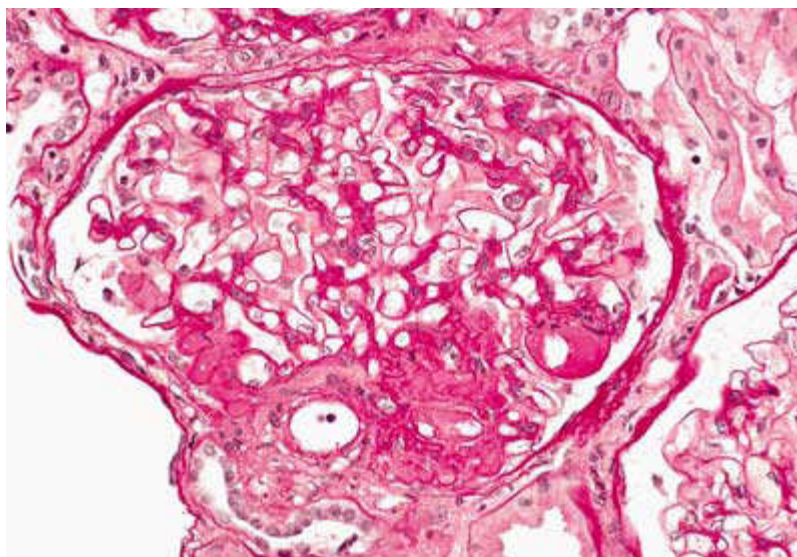
lumen kapiláry, často dochází ke zvýšení počtu podocytů a hyalinóze (viz Obr. 2)

2. perihilární FSGS (PH) – postižený glomerulus se vyznačuje perihilární hyalinózou a/nebo sklerózou (viz Obr. 3)
3. buněčná FSGS (CELL) – (viz Obr. 4)
4. kolabující FSGS (COLL) – (viz Obr. 5)
5. periferní FSGS – (viz Obr. 6)

(D'AGATI 1994, 2003, D'AGATI *et al.* 2004, STOKES *et al.* 2006)



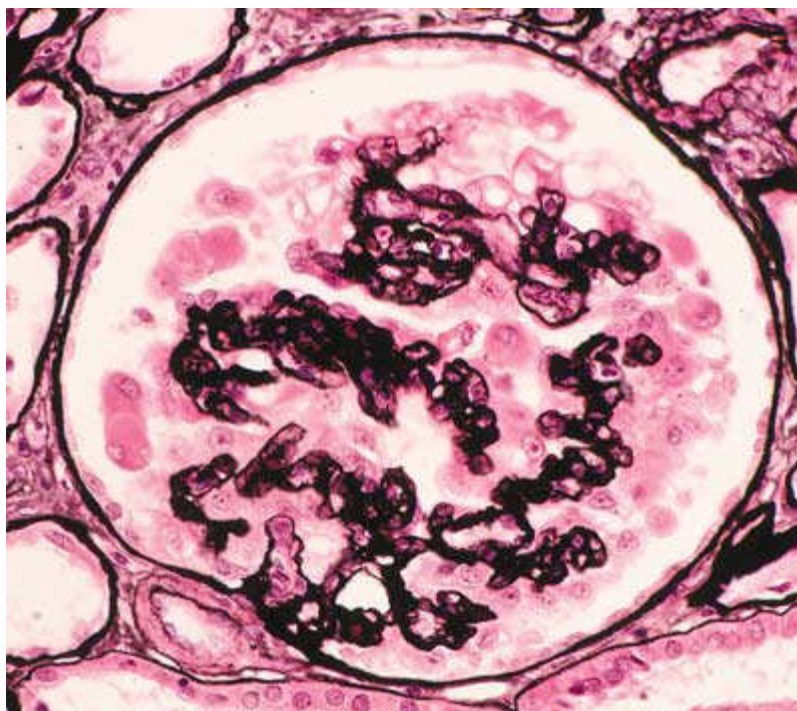
Obr. 2: NOS FSGS – jasně rozeznatelné zničení lumen kapiláry díky hromadění hyalinu a extracelulární matrix (400 x zvětšeno). Převzato a upraveno ze STOKES *et al.* 2006.



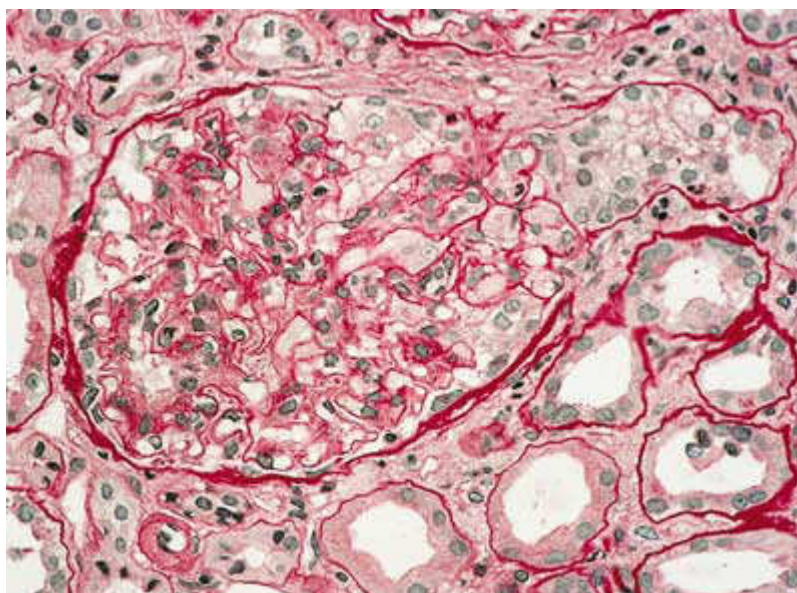
Obr. 3: PH FSGS – viditelné částečné ucpání glomerulárních kapilár extracelulární matrix a hyalínem v oblasti hilu (250 x zvětšeno). Převzato a upraveno ze STOKES *et al.* 2006.



Obr. 4: CELL FSGS – zahlcení lumen kapiláry pěnovými buňkami (400 x zvětšeno). Převzato a upraveno ze STOKES *et al.* 2006.



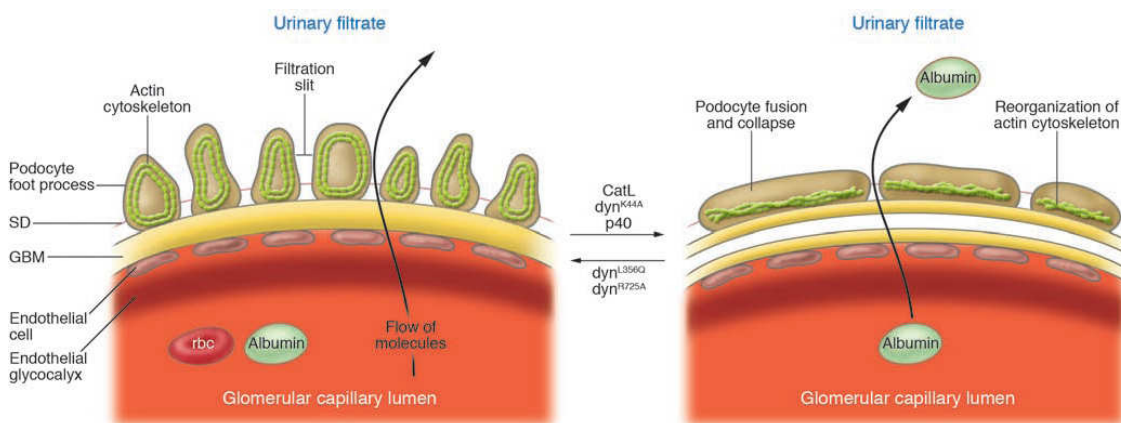
Obr. 5: COLL FSGS – obrázek zobrazuje ucpání kapilár díky kolapsu GBM, některé podocyty jsou uvolněné z GBM, podocyty jsou také hypertrofické (400 x zvětšeno). Převzato a upraveno ze STOKES *et al.* 2006.



Obr 6: Periferní FSGS – částečné hromadění pěnových buněk v oblasti počátku proximálního tubulu (250 x zvětšeno). Převzato a upraveno ze STOKES *et al.* 2006.

Vývoj FSGS je částečně odlišný u primárních a sekundárních forem. Po poškození podocytů u primární formy následuje tzv. foot process effacement, což znamená zploštění a fúze pedicel podocytů (viz Obr. 7) způsobené vratnou přestavbou

aktinového cytoskeletu, která proběhne během několika minut. Aktinový cytoskelet hraje nezastupitelnou úlohu nejen ve stabilitě vnitřní struktury membránových domén podocytů, ale i v celkové struktuře podocytů (KERJASCHKI 2001, RONCO 2007). U primárních forem se vyskytuje foot process effacement ve větším rozsahu než u forem sekundárních (DEEGENS *et al.* 2008). Následuje aktivace a proliferace parietálních epiteliálních buněk (PEC) ve vnější vrstvě Bowmanova váčku, což vede k obklopení sklerotického glomerulu tímto epitelem. Některé PEC migrují z vnější vrstvy váčku do vrstvy vnitřní a zde začnou pokrývat vnější stranu glomerulární bazální membrány (GBM) oddělující fenestrovaný endotel kapilár glomerulárního klubíčka a pedicely podocytů. PEC také začnou produkovat extracelulární matrix (SMEETS *et al.* 2004, ASANO *et al.* 2005, DIJKMAN *et al.* 2005). Parietální epiteliální buňky mohou být také nazývány parietální podocyty, protože exprimují některé proteiny typické pro podocyty. Mezi tyto proteiny patří např. podokalyxin, nefrin, podocin, α -aktinin 4 a synaptopodin (BARIETY *et al.* 2006).



Obr. 7: Zploštění a fúze pedicel podocytů. Převzato a upraveno z RONCO 2007.

U sekundárních forem FSGS následuje po poškození podocytů také foot process effacement (viz Obr. 7), který končí oddělením podocytů od GBM (KRIZ 1996). Počty podocytů na GBM klesají, protože tyto buňky se nedělí (NAGATA a KRIZ 1992) nebo po navození specifických podmínek podstoupí jen mitózu, tedy jaderné dělení, které ovšem nenásleduje cytokineze, tedy dělení buňky (KRIZ *et al.* 1995). Holá místa na GBM obsadí parietální epiteliální buňky, což vede k adhezi glomerulárního klubíčka s Bowmanovým pouzdrem. Uvnitř adheze kapiláry a

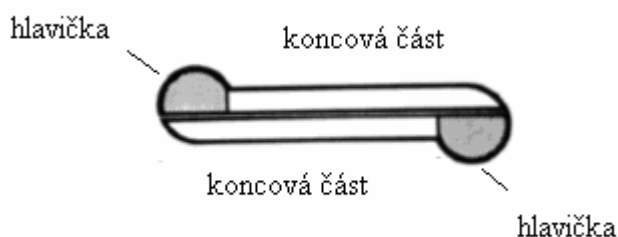
mezangium kolabují nebo se ucpávají hyalinem nebo trombózami (SHIRATO *et al.* 1996). V místech adheze také dochází k nesprávné filtraci, protože filtrovaná tekutina uniká do periglomerulárního prostoru, který je nakonec vrstvou kortikálních fibroblastů oddělen od kortikálního intersticia (KRIZ *et al.* 1998a).

Částečné poškození se následně rozšiřuje po celém glomerulu. Právě toto rozšíření popisuje několik modelů. První model hovoří o tom, že nesprávně řízená filtrace zapříčiní šíření poškození do celého glomerulu a následně i do proximálního tubulu. Výše popsany peritubulární prostor plynule přejde do prostoru paratubulárního. Tento velký prostor vznikne odloučením epitelia proximálního tubulu od tubulární bazální membrány (TBM) (KRIZ *et al.* 1998b). Další varianta říká, že nadměrná resorpce proteinů, které unikly při filtraci v poškozeném glomerulu, v proximálním tubulu vede k syntéze vazoaktivních a zánětlivých proteinů (ednotelin a MCP-1) tubulárními buňkami. Tato exprese vede k opakovaným zánětům končícími intersticiální fibrózou (REMUZZI *et al.* 1997, KRIZ *et al.* 1998b). Třetí mechanismus spočívá v tom, že vazoaktivní hormony angiotenzin II (Ang II) a epitelin 1 (ET-1) mohou působit i jako růstové faktory, které zapříčiňují tvorbu extracelulární matrix a tím intersticiální fibrózu (EGIDO 1996, KRIZ *et al.* 1998b). Poslední varianta ukazuje na to, že tubulární a intersticiální buňky začnou produkovat růstové faktory (PDGF), které stimulují jejich fibroblasty k proliferaci a následně k tvorbě extracelulární matrix, což opět vede k intersticiální fibróze (TANG *et al.* 1996, KRIZ *et al.* 1998b).

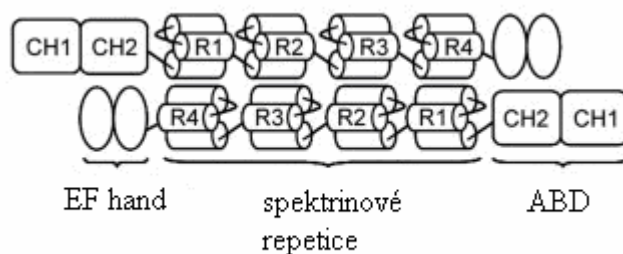
2.4 α -AKTININ

Protein α -aktinin je F-aktin spojující a vázající protein (MARUYAMA a EBASHI 1965), který patří do superspektrínové nadrodiny vysoce konzervovaných aktin vázajících proteinů. Mezi tyto proteiny patří také spektriny a dystrofin (BYERS *et al.* 1989, DAVISON *et al.* 1989). Strukturou se jedná o antiparalerní homodimer skládající se z hlavičky a koncové části (viz obr . 8) (IMAMURA *et al.* 1988). α -Aktinin se skládá ze 3 hlavních strukturních domén, kterými jsou N-terminální doména, vnitřní část obsahující 4 spektrínové repetice (R1 – R4) a C-terminální doména. V N – terminální části se nachází 2 kalponin homologní domény (CH 1 a CH 2) obsahující aktin vázající místa. V C-terminální doméně jsou 2 EF-hand domény, které mohou vázat Ca^{2+} ionty (viz Obr. 9, 10, 11, 12) (BARON *et al.* 1987, LEINWEBER *et al.* 1999). Do oblasti druhé kalponinové homologní domény (CH 2)

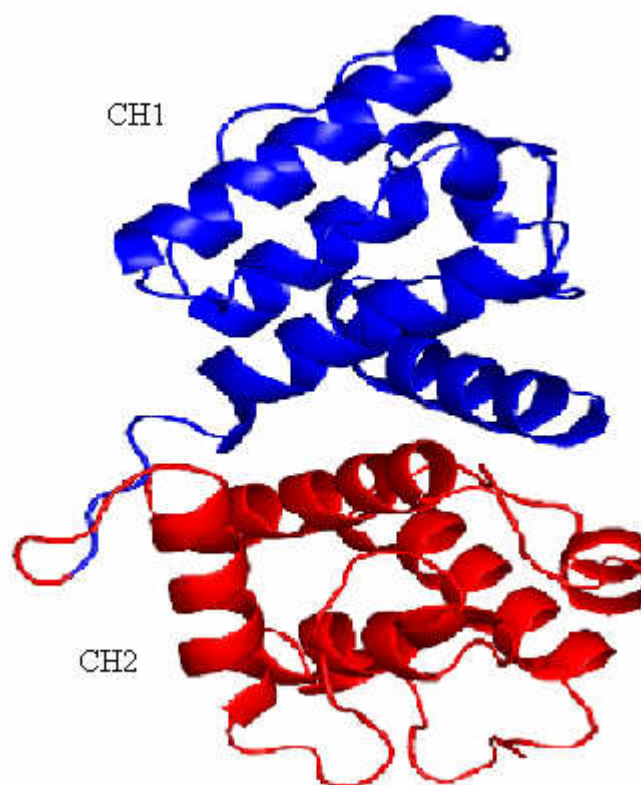
se mohou vázat fosfatidylinositoly a tím ovlivňovat funkci α -aktininů a následně i plasticitu aktinového cytoskeletu (FUKAMI *et al.* 1996, FRALEY *et al.* 2003, 2005, CORGAN *et al.* 2004). Mezi další vazebné partnery α -aktininů patří také např. vinkulin (BELKIN a KOTELIANSKY 1987, MCGREGOR *et al.* 1994), β -integriny (OTEY *et al.* 1990, PAVALKO a LAROCHE 1993), a fosfatidylinositol-3 kináza (SHIBASAKI *et al.* 1994).



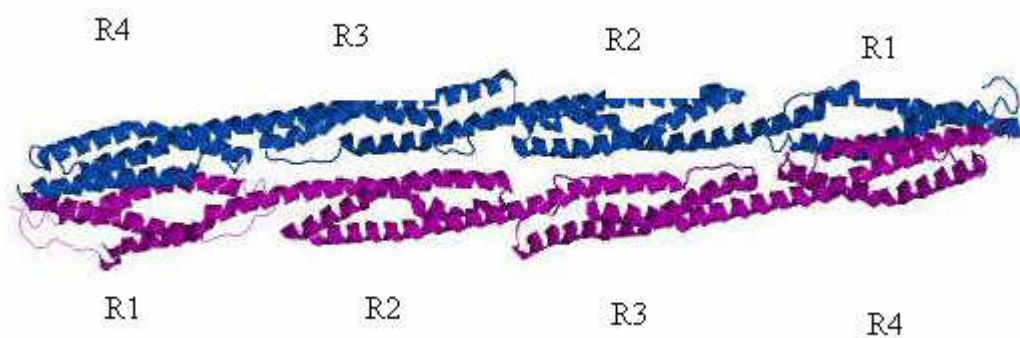
Obr. 8: Schématické zobrazení struktury molekuly α -aktiniu, hlavička je N-terminální doména. Převzato a upraveno z IMAMURA *et al.* 1988.



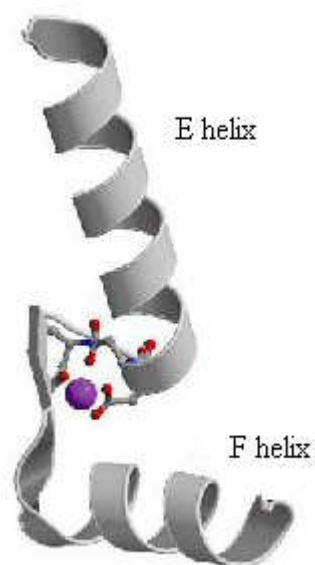
Obr. 9: Zobrazení domén molekuly α -aktiniu. Převzato a upraveno z MICHAUD *et al.* 2009.



Obr. 10: Kalponin homologní domény α -aktininu. Převzato a upraveno z <http://www.med.upenn.edu/dominguez/Gallery.html>.



Obr. 11: Spektrínové domény α -aktininu. Převzato a upraveno z ADDARIO 2011.



Obr.12: EF-hand doména α -aktininu. Fialová kulička znázorňuje Ca^{2+} . Převzato z <http://chemistry.umeche.maine.edu/CHY431/Proteins8.html>.

Nesvalové formy α -aktininu jsou na rozdíl od svalových forem citlivé na vápenaté kationty, které inhibují vazbu k aktinu (BURRIDGE a FERAMISCO 1981, NOEGEL *et al.* 1987). Tyto formy mohou být také fosforylovány tyrozin kinázou FAK v oblasti aktin vázající domény. FAK dependentní signalizace negativně ovlivňuje vazbu α -aktininu k aktinu a tím pravděpodobně ovlivňuje vlastnosti cytoskeletu buněk (IZAGUIRRE *et al.* 2001). Nesvalové formy se účastní i fokálních adhezí (OTEY *et al.* 1990, MICHAUD *et al.* 2006) a nachází se podél aktinových kontraktilních vláken (tzv. stress fibers) (MCKENNA a WANG 1986, MICHAUD *et al.* 2006), kde asociují s CLP-36 proteinem (VALLENIUS *et al.* 2000). Vazebnými partnery nesvalových forem mohou být také GLUT4 (FOSTER *et al.* 2006) a BP180 účastníci se buněčných spojů hemidezmozomů (GONZALEZ *et al.* 2001).

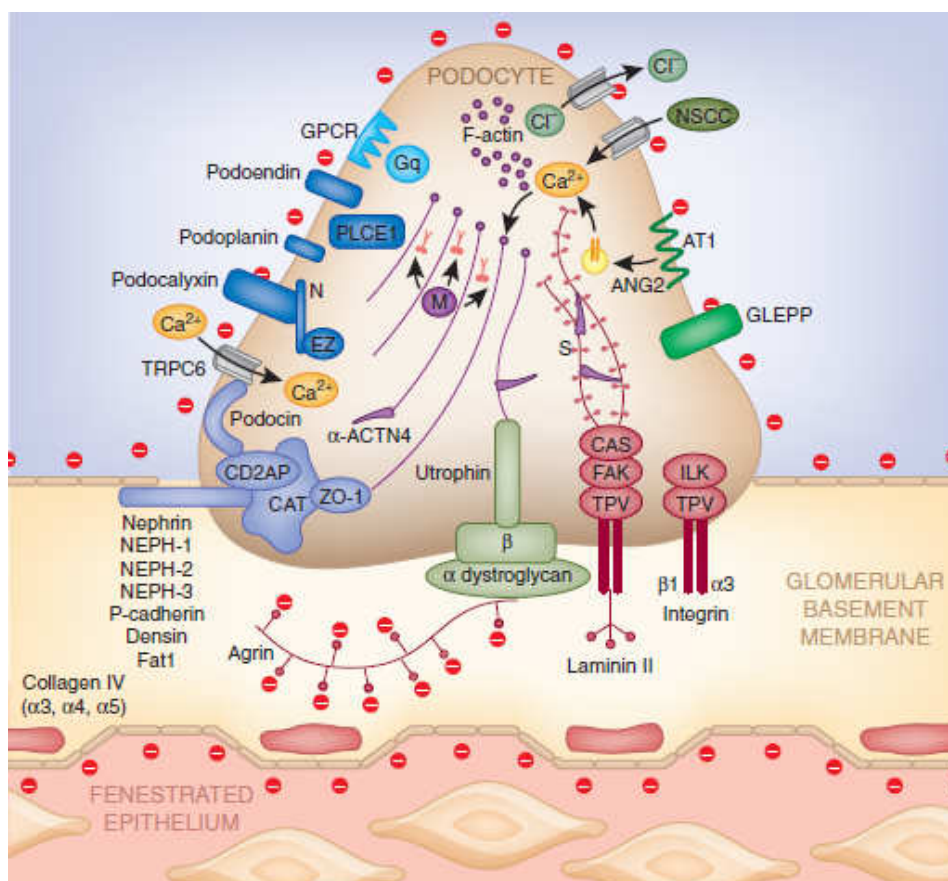
Lidské izoformy α -aktinin 2 a 3 se nachází ve svalech (BEGGS *et al.* 1992). Nesvalové formy jsou α -aktinin 1 (YOUSOUFIAN *et al.* 1990) a α -aktinin 4 (HONDA *et al.* 1998), o kterém pojednává následující kapitola 2.5.

2.5 α -AKTININ 4

α -Aktinin 4 je kódován genem *ACTN4*, který se u člověka nachází na dlouhém raménku 19. chromozomu v pozici 13 (KAPLAN *et al.* 2000). Jak vyplývá z předchozí kapitoly, jedná se o nesvalovou formu α -aktininu. Je to F-aktin spojující a vázající protein účastnící se také fokálních adhezí a nacházející se podél kontraktálních vláken, který patří do superspektrínové nadrodiny. Strukturou α -aktininu 4 je antiparalerní homodimer, který se skládá ze 3 hlavních částí. Těmito částmi jsou N-terminální část se 2 kalponin homologními doménami sloužícími k vázání aktinu, 4 vnitřní spektrínové repetice a C – terminální část, ve které se nachází 2 EF-hand domény pro navázání vápenatých kationtů. Kromě výše uvedených domén α -aktinin 4 také obsahuje vazebná místa pro fosfatidylinozitol-3 kinázu a fosfatidylinozitoly. Tento protein může interagovat s různými dalšími proteiny, mezi které patří vinkulin, β 1-integriny a fosfatidylinozitol-3 kinázu. Mezi jeho další vazebné partnery patří také např. synaptopodin (ASANUMA *et al.* 2005), iNOs (DANILIUC *et al.* 2003), ZO-1 (CHEN *et al.* 2006), PAI-1 (MAGDOLEN *et al.* 2004), denzin 180 a CamKII (WALIKONIS *et al.* 2001), RN-tre, který se současně může vázat k F-aktinu (LANZETTI *et al.* 2004), BERP protein exprimovaný v mozku (EL-HUSSEINI *et al.* 2000) a MAGI-1 protein, který se účastní těsných spojů (PATRIE *et al.* 2002). Kromě fosforylace FAK kinázou a vápenatými ionty může být α -aktinin 4 ovlivňován i fosforylací na tyrozinech, kterou vyvolává epidermální růstový faktor (EGF). Tato fosforylace také inhibuje vazbu proteinu k aktinovému vláknu (SHAO *et al.* 2010b). Je jisté, že α -aktinin 4 hraje také důležitou a nezastupitelnou roli v pohyblivosti buněk (HONDA *et al.* 1998, SHAO *et al.* 2010a).

Vliv Ca^{2+} na α -aktinin 4 zkoumali Weins a kol., kteří ve své studii prokázali, že molekulární změny v aktin vázající doméně (ABD) zvyšují afinitu α -aktininu k aktinu a zároveň se takový protein stává rezistentní na regulaci vápenatými ionty. Při své práci používali lidský K255E mutovaný α -aktinin 4, který porovnávali se zdravou formou (WEINS *et al.* 2007). K podobnému závěru dospěli již v roce 2003 Michaud a kol., kteří zkoumali myší mutantní variantu K256E, což je analog k lidskému změněnému proteinu K255E. Jejich skupina prokázala také zvýšenou afinitu k F-aktinu, avšak se již nezabývala senzitivitou mutovaného proteinu k Ca^{2+} (MICHAUD *et al.* 2003). V roce 2009 se Michaud vrátil k myší mutaci K256E. Tentokrát ji porovnával s formami necitlivými k Ca^{2+} (mutace v EF-hand motivu) a k fosfatidylinozitolům (mutace v fosfatidylinozitol vazebné sekvenci). Mutované

proteiny byly porovnávány se zdravým proteinem. Zvýšenou afinitu k F-aktinu projevily fosfatidylinozitol-necitlivá varianta a opět mutantní K256E. Naproti tomu afinita proteinu s mutací v Ca^{2+} vazebné doméně byla na srovnatelné úrovni jako nemutovaná varianta (MICHAUD *et al.* 2009). Citlivost α -aktininu 4 k Ca^{2+} také reguluje aktivitu NHE3. Při zvýšené hladině Ca^{2+} se α -aktinin 4 váže s E3KARP proteinem a spolu inhibují aktivitu NHE3 výměníku (KIM *et al.* 2002).



Obr. 13: Schématické znázornění lokalizace α -aktininu 4 v podocyty. Převzato a upraveno z WINN 2008.

V lidských podocytech je jako jediná forma α -aktininů exprimován α -aktinin 4 produkt genu *ACTN4* (viz Obr. 13) (KAPLAN *et al.* 2000), avšak u myší je kromě α -aktininu 4 v podocytech exprimován i α -aktinin 1 (KOS *et al.* 2003).

Mutace v genu *ACTN4* jsou spojovány s idiopatickým NS. Histologicky se jedná buď o MCN nebo o FSGS (REITEROVÁ a ŠAFRÁNKOVÁ 2010). V současné době je v tomto genu známo jen několik málo mutací s předpokládaným patologickým důsledkem (KAPLAN *et al.* 2000, WEINS *et al.* 2005, CHOI *et al.* 2008, DAI *et al.*

2009, 2010). Tabulka 1 představuje mutace a změny v *ACTN4* s předpokládanými patologickými důsledky, Tabulka 2 shrnuje známé SNPs a změny, u kterých se nepředpokládá patologický důsledek nebo nebyl potvrzen. .

exon	pozice NT: c.NM_004924.3	pozice AK	reference
IVS1	c.1-1044delT+1-797T>C+1-769A>G	-	Dai <i>et al.</i> 2010
IVS1	c.1-590delA	-	Dai <i>et al.</i> 2010
IVS1	c.1-34C>T	-	Dai <i>et al.</i> 2010
2	c.175T>C	p.Trp59Arg	Weins <i>et al.</i> 2005
2	c.184T>A	p.Ser62Thr	Dai <i>et al.</i> 2009
4	c.445-447delATC	p.Ile149del	Weins <i>et al.</i> 2005
8	c.763A>G	p.Lys255Glu	Kaplan <i>et al.</i> 2000
8	c.776C>T	p.Thr259Ile	Kaplan <i>et al.</i> 2000
8	c.784T>C	p.Ser262Pro	Kaplan <i>et al.</i> 2000
8	c.785C>T	p.Ser262Phe	Choi <i>et al.</i> 2008

Tabulka 1: Popsané mutace a změny s předpokládanými patologickými důsledky. Převzato a upraveno z KAPLAN *et al.* 2000, WEINS *et al.* 2005. CHOI *et al.* 2008, DAI *et al.* 2009, 2010.

exon	pozice NT: c.NM_004924.3	pozice AK
1	c.16G>A	p.Ala6Thr
2	c.207A>G	p.Thr69
2	c.243C>T	p.Leu82
5	c.537G>A	p.Pro179
5	c.546C>T	p.Asn182
6	c.606C>T	p.Ile202
7	c.657delC	posun ORF
8	c.738C>T	p.Ile246
8	c.798T>C	p.His266
10	c.929G>A	p.Arg310Gln
10	c.978G>A	p.Gln326
10	c.1043A>G	p.Gln>Arg
10	c.1119G>C	p.Met373Ile
11	c.1204C>G	p.Leu402Val
11	c.1279C>A	p.Ala427Thr
13	c.1518C>T	p.Gly506
16	c.1920G>A	p.Glu640
16	c.1977T>C	p.Asn659
19	c.2400C>T	p.Asp800
19	c.2401G>A	p.Val801Met
20	c.2510G>A	p.Arg837Gln
20	c.2563T>C	p.Leu855

exon	pozice NT: c.NM_004924.3	pozice AK
21	c.2607A>G	p.Arg869
21	c.2622C>T	p.Asp874
21	c.2670C>A	p.Asp890Glu

Tabulka 2: Popsané SNPs a změny, u kterých patologický důsledek není předpokládán nebo nebyl potvrzen. Převzato z WEINS *et al.* 2005, DAI *et al.* 2009, www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_reg.cgi?locusId=81.

U variant Trp59Arg, Ile149del, Lys255Glu, Thr259Ile a Ser262Pro v *ACTN4* byla prokázána zvýšená afinita α -aktininu 4 k F-aktinu (KAPLAN *et al.* 2000, WEINS *et al.* 2005). Penetrance onemocnění spojeného s mutací v *ACTN4* je vysoká, avšak nedosahuje 100%. To znamená, že pacient, který je nosič mutace, nemusí manifestovat symptomy nemoci (AUCELLA *et al.* 2005).

Kromě cytoplazmy se α -aktinin 4 vyskytuje také v jádře, kam se dostává přes jaderný pór v komplexu s integrinem. Z jádra je exportován prostřednictvím CRM-1 dependentní dráhy. Jeho jaderná koncentrace je v G2 fázi buněčného cyklu výrazně vyšší než v G1 fázi. Bylo nalezeno, že v jádře je v interakci s chromatin remodelujícím komplexem INO 80 a také s UBF faktorem uplatňujícím se v transkripci rRNA během M fáze buněčného cyklu (KUMETA *et al.* 2010).

α -Aktinin 4 hraje také důležitou roli v nádorových onemocněních a následně i v jejich šíření prostřednictvím metastáz. V této souvislosti byl zkoumán jeho vliv u rakoviny prsu (HONDA *et al.* 1998) a plic (ECHCHAKIR 2001), rakoviny tlustého střeva s metastázemi do lymfatických uzlin (HONDA *et al.* 2005), duktálního karcinomu slinivky břišní (KIKUCHI *et al.* 2008), rakoviny vaječníků (YAMAMOTO *et al.* 2009) a gliomy (SEN *et al.* 2009, QUICK a SKALLI 2010).

3 MATERIÁL

3.1 DNA PACIENTŮ S NEFROTICKÝM SYNDROMEM

DNA pacientů s NS byla izolována z 200 µl žilní krve na lince QIAcube od společnosti Qiagen, Německo. Izolace byla provedena s použitím kitu QIAamp DNA mini kit (250) pocházející od stejné společnosti. Koncentrace vyizolované DNA byla měřena na nanofotometru od firmy Implen GmbH, Německo. Vzorky krve, které byly odebrány do zkumavky s EDTA, pocházely z Kliniky nefrologie ve VFN a FN Motol. Před odběrem krve byl každým pacientem podepsán informovaný souhlas se zařazením do probíhajícího výzkumu. Tabulka 3 charakterizuje 48 pacientů, jejichž DNA byla použita. Izolace DNA byla provedena laborantkami laboratoře.

číslo pacienta	pohlaví	věk nástupu NS	věk v roce 2011	senzitivita k léčbě kortikoidy
1	žena	18	20	KR
2	muž	20	35	KR
3	žena	35	37	KR
4	žena	25	43	KR
5	muž	58	60	KR
6	muž	38	50	KR
7	muž	53	61	KR
8	**	**	**	**
9	**	**	**	**
10	**	**	**	**
11	**	**	**	**
12	**	**	**	**
13	**	**	**	**
14	**	**	**	**
15	žena	57	59	KS
16	žena	54	59	*
17	muž	32	45	KR
18	muž	30	37	*
19	muž	26	41	KR
20	žena	55	67	KR
21	žena	18	23	*
22	žena	30	37	KR
23	muž	10	34	KS
24	žena	20	26	KR
25	žena	16	29	KR
26	muž	70	76	KR
27	žena	39	45	KR
28	žena	18	28	KR

číslo pacienta	pohlaví	věk nástupu NS	věk v roce 2011	senzitivita k léčbě kortikoidy
29	muž	18	27	KR
30	muž	61	67	KR
31	žena	32	37	KR
32	muž	18	35	KR
33	žena	55	60	KR
34	žena	66	71	KR
35	muž	25	29	KR
36	žena	49	53	KR
37	žena	80	***	KR
38	žena	37	42	*
39	žena	33	61	KR
40	muž	63	67	KR
41	žena	**	15	KS
43	muž	**	8	KS
45	žena	28	31	KR
46	žena	18	33	KR
47	žena	35	46	KR
48	muž	22	29	KR
49	muž	8	20	KR
50	žena	30	48	KR

Tabulka 3: Charakteristika pacientů, u nichž probíhala mutační analýza genu *ACTN4*. Pacienti 42 a 44 byli vyřazeni kvůli malému množství DNA. Na jejich místo byli zařazeni pacienti 49 a 50. KR znamená kortikorezistentní a KS je kortikosenzitivní.

* Tito pacienti nepodstoupili léčbu kortikoidy.

** Danou informaci nebylo možno dohledat.

*** Pacient již zemřel.

3.2 DNA ZDRAVÝCH OSOB

DNA zdravých osob byla izolována z 200 µl žilní krve na lince QIAcube od společnosti Qiagen, Německo. Izolace byla provedena s použitím kitu QIAamp DNA mini kit (250) pocházející od stejné společnosti. Koncentrace vyizolované DNA byla měřena na nanofotometru od firmy Implen GmbH, Německo. Krev, která byla odebrána do zkumavky s EDTA, pocházela od osob obou pohlaví. Jejich DNA byla použita při ověřování některých SNPs v exonech a jiných nálezů, u kterých bylo možno předpokládat kauzální význam pro NS. Všechny osoby podepsaly před odběrem informovaný souhlas se zařazením do probíhajícího výzkumu. Izolace DNA byla provedena laborantkami laboratoře.

3.3 DNA PŘÍBUZNÝCH NĚKTERÝCH PACIENTŮ

Tato DNA pocházela od osob příbuzných pacientů, u kterých bylo zapotřebí ověřit způsob přenosu některých objevených nálezů. Jejich DNA byla izolována z 200 µl žilní krve na lince QIAcube od společnosti Qiagen, Německo. Izolace byla provedena s použitím kitu QIAamp DNA mini kit (250) pocházející od stejné společnosti. Koncentrace vyizolované DNA byla měřena na nanofotometru od firmy Implen GmbH, Německo. Krev byla odebrána do zkumavky s EDTA. Všichni podepsali před odběrem krve informovaný souhlas se zařazením do probíhajícího výzkumu. Izolace DNA byla provedena laborantkami laboratoře.

3.4 PRIMERY

Pro analýzu genu *ACTN4* bylo použito 21 přímých a 21 zpětných primerů (viz Tabulka 4). Primery byly navrženy v programu Primer-Blast a vyrobeny firmou GENERI BIOTECH, ČR. Optimální anelační teploty primerů pro každý exon byly hledány pomocí PCR reakce při teplotním gradientu. Pokud primery tvořily více produktů při PCR reakci nebo při HRM analýze, byly předělávány.

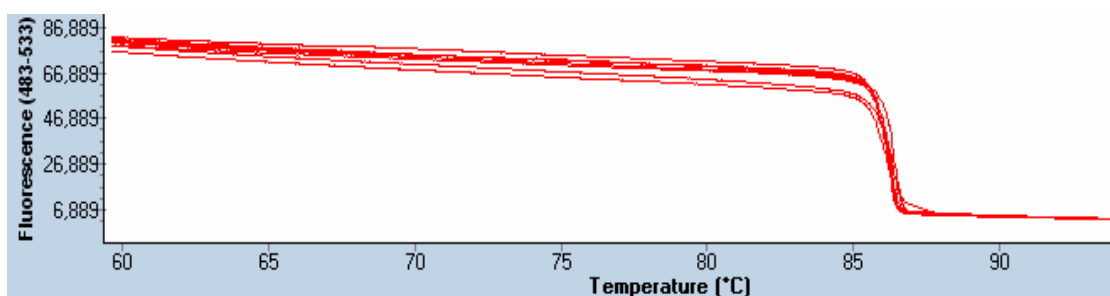
exon	přímý primer (5'→3')	zpětný primer (5'→3')
1	AGCTGAGGCGGGAGCGGAC	GGCCCCCTCAGAAAAGCCCCT
2	AGAGAGCCCCGACAGCCAGG	ATGGGACAGCTGGGTGGGCA
3	GGGCCAGCAGAGGAACCTGC	AGCGCCCTGCCACCAACAAA
4	GCCACCTTCAGGTTGGGCGG	GGAGCCAAGAGGCAGGCAGC
5	ACCCAGGCCTGAGCCGAAA	GGGCTGACTGAGGGCTGGCA
6	CCTGGCACAGGCCAGACTGC	AGGGGGTCAGACAGGGCACG
7	GTGCCCTCCCGCTCACACAT	ATGTGCCACAGCCCCTTGC
8	GGGAGCCCGTGGATCCCAGT	TGAGCACGGGAGGCGAGAGG
9	AAGGGACGTGCCCCGTCAGGA	TGGTCTGTGACCACGCAGCC
10	GGCAGCCCGTCAGCACTCTG	TAGGGCTGCCTCTGCCCTG
11	ATCCCCCTGGGTGCCTCCAC	GTGGCAGGGGGCTGTGTGTG
12	CCCCTCCAGACTCCTGCCCC	GCAGTTGGGGCACTGGGGAC
13	TGGCCTGGGAACCTTGGGGG	CTCTCCGTGGGAGGTGGGGG
14	CCCCCACCTCCACGGAGA	AGGAGCTGGAGTGAGGGGGC
15	AGAGCCTCTGTGGGGCTGGG	TGGGAGCGGTCAGGGAGGTG
16	TACACCACCGTCACCCCGCA	CGGGGACCCCTCACTACGG
17	AGGTGGTCAGTGGGGGCAGG	TCCAGTGAGGAAGCCGGCCA
18	TTTCCCCAGGGCGGGAGGAC	AGGTGTGGGCTGGTACGGCA
19	CATCCTGGTCTCCACGCCGC	CCGCCCCATGTGCACAGCA
20	CACCAGTGTGGGCCTGGCTG	TCTGGGGCAGGCAGGATGGG
21	AGCGAGACCCCTACGAGGTGC	GGAATGGGACTGTGGGGCTGC

Tabulka 4: Primery použité pro analýzu genu *ACTN4*.

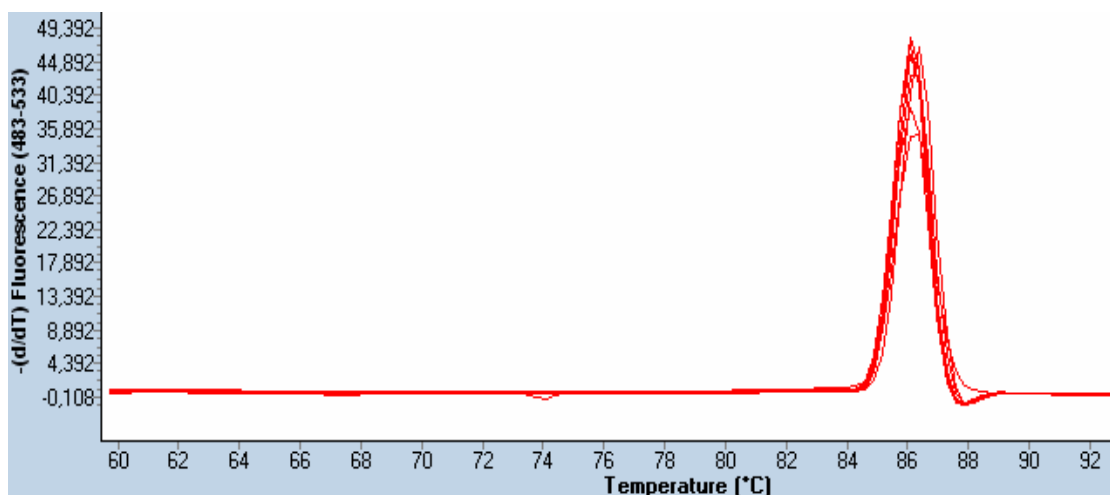
4 METODY

4.1 HIGH RESOLUTION MELTING

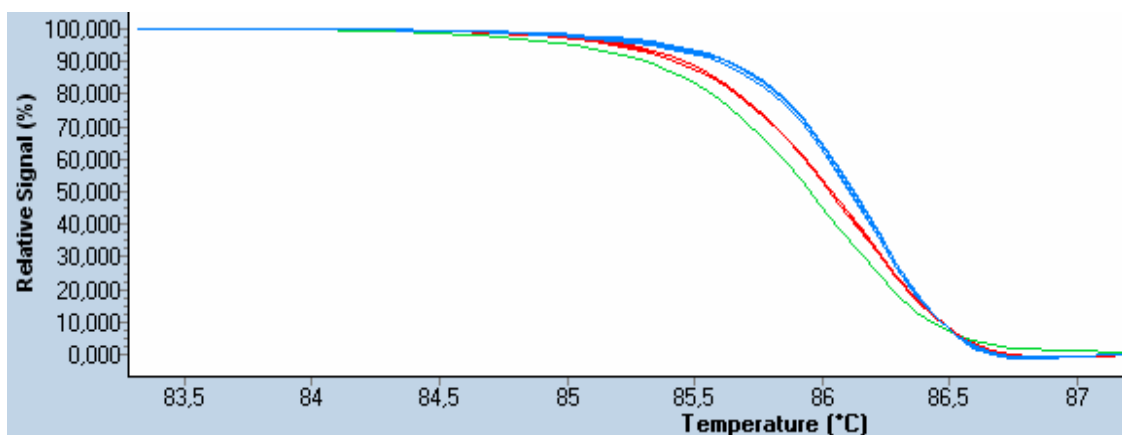
Technika high resolution melting (HRM) byla vyvinuta ve spolupráci Idaho Technology a University of Utah. Tato metoda je založena na analýze a srovnání teplot a křivek tání různých vzorků dsDNA. Hlavními částmi analýzy jsou PCR a HRM analýza. Během PCR se do ds DNA váže fluorescenční barvivo SYBR green, jehož intenzita fluorescence se při přechodu dsDNA do ssDNA snižuje. Změny intenzity fluorescence barviva jsou detekovány a následně vyhodnoceny programem Light Cycle 480 Gene Scanning Software (viz Obr. 14, 15, 16, 17). Metodu HRM je možno použít např. k detekci SNPs a mutací, analýze metylace DNA atd. Metoda HRM byla použita k detekci SNPs a dalších změn v genu *ACTN4* pacientů s nefrotickým syndromem.



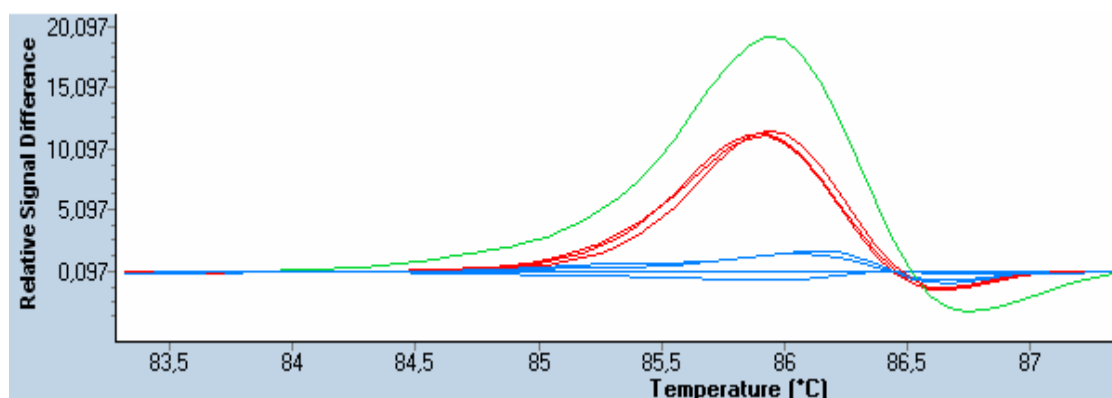
Obr. 14: Křivky tání dsDNA 8 pacientů s nefrotickým syndromem pro exon 5 genu *ACTN4*. Osa x zobrazuje teplotu v °C a osa y úroveň fluorescence.



Obr. 15: Zobrazení teplotního vrcholu tání dsDNA 8 pacientů s NS pro exon 5 genu *ACTN4*. Osa x zobrazuje teplotu v °C a osa y úroveň fluorescence.



Obr. 16: Výsledek HRM analýzy křivek tání dsDNA 8 pacientů s nefrotickým syndromem pro exon 5 genu *ACTN4*. Modré křivky zobrazují DNA bez změn, v DNA, kterou zobrazují červená a zelená barva, byly detekovány změny oproti referenční sekvenci. Osa x zobrazuje teplotu v °C a osa y úroveň fluorescence v procentech.



Obr. 17: Zobrazení křivek tání dsDNA 8 pacientů s nefrotickým syndromem pro exon 5 genu *ACTN4* na základě rozdílů jejich fluorescenčního signálu. Osa x zobrazuje teplotu v °C a osa y rozdíl úrovně fluorescence.

Na základě HRM analýzy každého exonu genu *ACTN4* byli vybráni pacienti, u nichž byla následně provedena sekvenace. Kritéria pro následnou sekvenaci byly sklon a posunutí křivek tání dsDNA, jak zobrazují Obr. 16 a 17.

HRM analýza probíhá v 10 µl objemu reakční směsi. Hlavními složkami reakční směsi jsou Master mix, $MgCl_2$, voda, primery a DNA. Do směsi může být přidáno i DMSO, které inhibuje tvorbu sekundárních struktur u primerů a templátové DNA. Při hledání správných poměrů složek je možno používat různé množství $MgCl_2$, vody a DMSO. Tyto poměry jsou pro každý exon genu *ACTN4* specifické a

charakterizuje je následující Tabulka 5. Použitá koncentrace primerů byla 10 pmol / μ l a koncentrace DNA byla 20 ng / μ l u pacientů s NS při mutační analýze a 10 ng / μ l u zdravých kontrol a pacientů s NS při ověřování nalezených záměn.

exon	Master mix (μ l)	MgCl ₂ (μ l)	voda (μ l)	DMSO (μ l)	primer F (μ l)	primer R (μ l)	DNA (μ l)
1	5	0,6	2,4	-	0,5	0,5	1
2	5	0,6	2,4	-	0,5	0,5	1
3	5	1	2	-	0,5	0,5	1
4	5	1	2	-	0,5	0,5	1
5	5	0,6	2,4	-	0,5	0,5	1
6	5	0,6	2,4	-	0,5	0,5	1
7	5	1	2	-	0,5	0,5	1
8	5	0,6	2,4	-	0,5	0,5	1
9	5	1	1,5	0,5	0,5	0,5	1
10	5	1	2	-	0,5	0,5	1
11	5	1	2	-	0,5	0,5	1
12	5	0,6	2,4	-	0,5	0,5	1
13	5	1	2	-	0,5	0,5	1
14	5	0,6	2,4	-	0,5	0,5	1
15	5	1	2	-	0,5	0,5	1
16	5	0,6	2,4	-	0,5	0,5	1
17	5	0,6	2,4	-	0,5	0,5	1
18	5	1	2	-	0,5	0,5	1
19	5	0,6	2,4	-	0,5	0,5	1
20	5	1	1,5	0,5	0,5	0,5	1
21	5	0,6	2,4	-	0,5	0,5	1

Tabulka 5: Poměr složek reakční směsi použitý při analýze 21 exonů genu *ACTN4*.

Celý HRM kit, tedy Master mix, MgCl₂ a voda, byl od společnosti Roche Diagnostics GmbH, Německo, DMSO pocházelo od společnosti MP Biomedicals, USA. Analýza byla provedena na přístroji Light Cycler 480 od společnosti Roche Diagnostics GmbH, Německo. Analýza probíhá v destičkách s 96 jamkami, které jsou kryty speciální průhlednou fólií. Před vložením destičky do přístroje je nutno ji stočit při 3500 rpm, po dobu 3 min. Pro konečnou analýzu pacientů s NS a zdravých kontrol byla pro pipetování reakční směsi do HRM destičky použita pipetovací linka ep Motion 5075, od firmy Eppendorf, Německo. Kromě specifického poměru složek v reakční směsi je nutno opakovaným zkoušením stanovit i počet cyklů v jednotlivých krocích a správných anelačních teplot pro PCR každého exonu. Předběžně byly

anelační teploty stanovovány při klasické PCR reakci. Následující Tabulka 6 charakterizuje anelační teploty a počty cyklů PCR pro jednotlivé exony genu *ACTN4*.

exon	T1 (°C)	počet cyklů při T1	T2 (°C)	počet cyklů při T2
1	65	10	63	50
2	66	10	66	40
3	63	10	60	40
4	63	10	63	50
5	63	10	63	50
6	63	10	63	50
7	63	10	60	40
8	66	10	66	50
9	63	10	60	40
10	65	10	63	40
11	65	10	65	30
12	66	10	66	50
13	65	10	65	30
14	68	10	68	40
15	66	10	66	60
16	66	10	66	50
17	66	10	66	50
18	63	10	63	50
19	66	10	66	50
20	63	10	60	32
21	66	10	66	50

Tabulka 6: Charakteristika anelačních teplot a počtu cyklů PCR jednotlivých exonů genu *ACTN4*.

Jak již bylo uvedeno výše, hlavními fázemi analýzy jsou PCR a HRM analýza. HRM analýza je rozdělena do fází denaturace dsDNA, zchlazení s tvorbou duplexů (tvoří se homoduplexy a heteroduplexy) a vlastní HRM analýza, kdy přístroj měří úbytek fluorescence během denaturace dsDNA při stoupající teplotě). K dalším fázím patří počáteční denaturace, závěrečná elongace a konečné chlazení. Charakteristické podmínky těchto kroků, které byly použity při mutační analýze, zobrazuje Tabulka 7. Produkt HRM reakce je možno použít jako templátovou DNA pro sekvenační reakci a následnou sekvenaci.

číslo cyklu	počet opakování	teplota (°C)	čas	poznámka
1	1	96	2 min.	aktivace polymerázy
2a	10	96	1 min.	amplifikace 1
2b		dle potřeby*	30 s	
2c		72	1 min.	
3a	dle potřeby*	95	30 s	amplifikace 2
3b		dle potřeby*	30 s	
3c		72	1 min.	
4	1	72	7 min.	závěrečná elongace
5a	1	95	5 min.	tání dsDNA
5b	1	40	1 min.	tvorba duplexů
5c	1	60	1 s	počátek HRM analýzy
5d	1	98	**	**
6	1	37	nekonečno	chlazení

Tabulka 7: Charakteristika jednotlivých kroků HRM analýzy. Během amplifikace se za sebou cyklicky opakují kroky aktivace polymerázy, nasedání primerů a syntéza templátové DNA (fáze 2a – 2c, 3a – 3c).

* Teploty a počet těchto kroků se lišily u jednotlivých exonů genu *ACTN4* a charakterizuje je Tabulka 6, kde teplotu fáze 3b zobrazuje teplota T2 a počet cyklů pro krok 3 zobrazuje příslušný počet cyklů k teplotě T2, teplotu kroku 2b zobrazuje sloupec T1. Tyto teploty a počty cyklů jsou charakteristické pro každý exon.

** V tomto kroku probíhá vlastní HRM analýza, kdy přístroj měří úbytek fluorescence během denaturace dsDNA při stoupající teplotě.

4.2 POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE

Polymerázová řetězová reakce (PCR) pochází z anglického názvu Polymerase Chain Reaction. Podstatou reakce je zmnožení vybraného úseku DNA, který je ohraničený z obou stran primery, podle exponenciálního vzorce 2^n , kde n je počet cyklů. Po určitém počtu cyklů dochází k tzv. fázi plató, kdy se již úsek DNA nemnoží. Hlavními složkami reakční směsi jsou reakční voda, PCR pufr, dNTPs (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), primery F a R, DNA polymeráza, $MgCl_2$ a templátová DNA. Při práci byl použit objem cca 50 μ l reakční směsi. Poměr složek směsi ukazuje následující Tabulka 8. Koncentrace DNA pacientů s NS byla 20 ng / μ l. Při hledání optimálních anelačních teplot primerů byly koncentrace použité DNA různé.

složka	objem (μl)	koncentrace	poznámka
reakční voda	37	-	-
Taq pufr	5	-	bez MgCl ₂ , s NH ₄
dNTPS	1	-	-
primer F	1	10 pmol / μl	-
primer R	1	10 pmol / μl	-
Taq polymeráza	1,2	-	-
MgCl ₂	3	25 mM	-
templátová DNA	1	-	-

Tabulka 8: Složky reakční směsi pro PCR reakci.

Taq pufr, Taq polymeráza a MgCl₂ byly vyrobeny firmou Fermentas International Inc., Kanada, dNTPs pochází od firmy Bio Rad Laboratories Inc., USA. Použitá voda je od firmy B. Braun Medical s.r.o., ČR.

PCR reakce probíhá ve 4 hlavních částech - počáteční denaturace, vlastní cykly reakce a závěrečná elongace, po níž následuje konečné chlazení. Ve druhé části probíhá fáze denaturace, nasedání primerů a vlastní syntéza templátové DNA. Každý krok probíhá při odlišné teplotě a v různém počtu cyklů. Následující Tabulka 9 zobrazuje podmínky PCR reakce, které byly použity při diplomové práci. PCR reakce probíhaly v termocycleru MY CYCLER verze 1.065 od firmy Bio Rad Laboratories Inc., USA.

číslo cyklu	počet opakování	teplota (°C)	čas	poznámka
1	1	95	4 min	aktivace polymerázy
2a	40	95	30 s	amplifikace
2b		dle potřeby *	30 s	
2c		72	30 s	
3	1	72	7 min	závěrečná elongace
4	1	4	nekonečno	chlazení

Tabulka 9: Charakteristika jednotlivých kroků PCR reakce. Během amplifikace se za sebou cyklicky opakují kroky aktivace polymerázy, nasedání primerů a syntéza templátové DNA (fáze 2a – 2c).

* použit gradient teplot nebo konstantní teplota.

Gradient teplot byl použit při hledání optimálních teplot primerů, konstantní teplota pak k syntéze některých exonů genu *ACTN4* pro následnou sekvenaci u pacientů, jejichž DNA nereagovala při HRM analýze.

4.3 HORIZONTÁLNÍ AGARÓZOVÁ ELEKTROFORÉZA

Principem elektroforézy je fakt, že nukleová kyselina je díky svým fosfátovým skupinám nositelem rovnoměrně rozloženého záporného náboje a v elektrickém poli se pohybuje ke kladně nabitě anodě. Rychlost tohoto pohybu je nepřímo úměrná logaritmu velikosti molekuly.

Základní složkou agarózového gelu je polysacharid agaróza. Ta je spolu s druhým polysacharidem agaropeptinem součástí přírodní látky agar, která se získává z některých druhů červených a mořských řas. Agaróza je složena z opakujících se dimerů D–galaktózy a 3,6–anhydrido–L–galaktózy. Na rozdíl od agaropektinu má agaróza nízký náboj. Agarózové gely se používají pro rozlišovací schopnost mezi 100 bp – 30 kbp. Gely byly připravovány dle následujícího postupu.

1. navázat agarózu dle potřebné koncentrace a rozmíchat ji v příslušném množství 1 x TBE pufru

Při diplomové práci byl použit 2 % gel, což odpovídá 2 g agarózy a 100 ml 1 x TBE pufru, který se připraví smícháním 1 600 ml destilované vody s 400 ml 5 x TBE, poměr tedy 4 : 1.

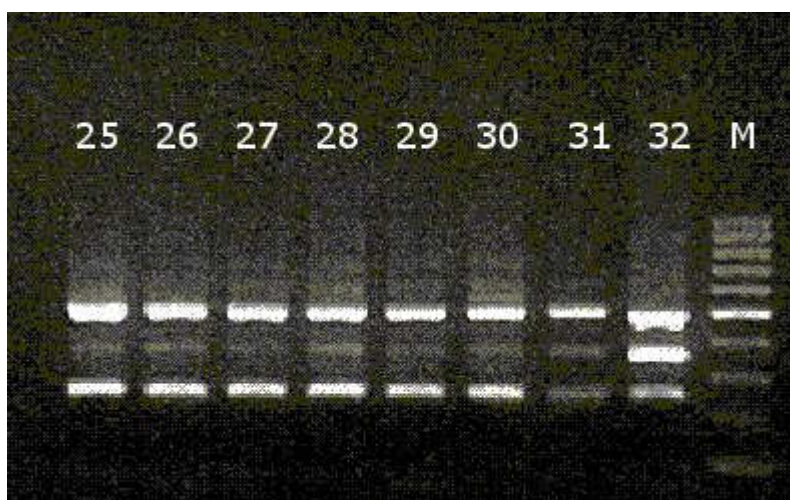
2. vzniklou směs rozvařit v mikrovlnné troubě
3. ochladit na cca 50 °C
4. vmíchat 1 % EtBr v poměru 1:10 000 (na 100 ml roztoku to je 10 µl EtBr)
5. nalít do vaničky a zasadit hřebínky
6. nechat gel ztuhnout po dobu 20 min.
7. chráněný fólií je možno gel uchovávat při teplotě 4 °C

Před nanášením vzorků DNA se gel vkládá do elektroforetické vany s dostatečným množstvím 1 x TBE pufru, gel musí být pod hladinou pufru a všechny jamky zality. Před nanesením vzorků na gel je v mikrotitrační destičce smícháno 5 µl vzorku DNA s 3 µl barvy (bromfenolová modř), která slouží jako marker vizuální kontroly elektroforézy. Po nanesení vzorků do jamek gelu je třeba přidat i 100 bp žebříček (použit od firmy Fermentas International Inc., Kanada), který slouží jako marker pro velikost získaných pruhů. Nakonec se elektroforetická vana přiklopí víkem spojeným se zdrojem stejnosměrného napětí pomocí kabelů a spustí se vlastní elektroforéza po dobu cca 30 min při napětí 150 V při laboratorní teplotě.

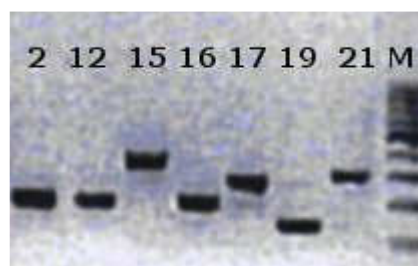
Délka PCR produktu je stanovena pomocí jeho srovnání se 100 bp velikostním markerem. EtBr, které se interkalovalo do dsDNA, absorbuje UV záření, jehož

zdrojem je UV transluminátor (použit LKB 2011 Macro Vue, od společnosti Pharmacia LKB, Švédsko), a emituje záření o vyšší vlnové délce oproti absorbovanému záření. Fluorescence EtBr se po navázání k DNA prudce zvyšuje a tím zviditelňuje polohu PCR produktu v gelu. Porovnáním polohy PCR produktu se 100 bp velikostním markerem je stanovena jeho přibližná délka. Gel je nakonec vyfotografován (viz Obr. 18, 19).

Agarózová elektroforéza byla použita ke kontrole kvality a délky produktu po PCR reakci nebo po HRM analýze.



Obr. 18: Ukázka kontroly velikosti fragmentů DNA po HRM reakci pomocí agarózové elektroforézy. Použité primery tvoří 3 produkty s přibližnými délkami 500 bp, 360 bp a 260 bp. V posledním sloupci je 100 bp velikostní marker. Použité primery pro exon 19 genu *ACTN4* byly následně předělány tak, aby tvořily pouze 1 produkt. Čísla 25 - 32 jsou čísla pacientů, M je velikostní marker.



Obr. 19: Ukázka kontroly velikosti fragmentů DNA po PCR reakci pomocí agarózové elektroforézy. Ve sloupcích jsou amplikony různých exonů genu *ACTN4* o přibližných délkách 200 bp, 300 bp a 400 bp. Čísla představují jednotlivé exony u stejného pacienta, M je velikostní marker.

4.4 KOLONKOVÉ ČIŠTĚNÍ PO PCR REAKCI

K čištění byl použit QIAquick PCR Purification Kit od společnosti Qiagen, Německo. Toto čištění bylo použito u některých vzorků DNA po PCR reakci. Přечиštěný produkt byl následně použit pro sekvenci reakci.

1. ke vzorku přidat 100 μ l vázacího pufru a celý objem přepipetovat na fritu kolonky
2. centrifugovat při 13 000 rpm po dobu 2 min.
3. slít tekutinu ze spodní části kolonky a hrdlo vysušit buničinou, na fritu kolonky napipetovat 740 μ l promývacího pufru
4. centrifugovat při 13 000 rpm po dobu 2 min.
5. slít tekutinu ze spodní části kolonky a hrdlo vysušit buničinou a centrifugovat při 13 000 rpm po dobu 2 min.
6. vrchní část kolonky vložit do plastové zkumavky a spodní část vyhodit
7. na fritu kolonky napipetovat 25 - 50 μ l eluačního pufru (podle síly produktu při kontrolní elektroforéze) a nechat 1 min. stát při laboratorní teplotě
8. centrifugovat při 13 000 rpm po dobu 2 min.

4.5 SEKVENAČNÍ REAKCE A SEKVENACE

Při sekvenační reakci dochází k syntéze templátového vlákna až do chvíle, kdy DNA polymeráza zařadí fluorescenčně značený ddNTP. Za ddNTP již nemůže být zařazen další nukleotid, protože na pozici 2' v cukerné složce nukleotidu je -OH skupina nahrazena vodíkem. Při reakci vznikne směs různě dlouhých fragmentů, které jsou následně děleny podle délky na kapilárové elektroforéze. Při průchodu kapilárou je snímána fluorescenční značka ddNTP, který zakončuje daný fragment DNA. Tento způsob sekvenování nazývaný Dye-terminator sequencing vychází z původní metody Fredericka Sangera.

Složkami směsi pro sekvenační reakci jsou sekvenační kit, voda, primer (pro příslušný úsek a směr), DMSO a templátová DNA. Při diplomové práci byly použity objemy reakce cca. 5 a 10 μ l. Tabulky 10 a 11 zobrazují poměry složek směsi pro příslušné objemy sekvenační reakce.

složka	objem (μl)	koncentrace
reakční voda	2	-
sekvenační kit	2	-
DMSO	0,25	-
primer	0,25	10 pmol / μl
templátová DNA	1 *	-

Tabulka 10: Poměr jednotlivých složek směsi pro sekvenační reakci v 5 μl.

* Objem templátové DNA byl určen podle množství produktu po PCR reakci nebo po HRM reakci.

složka	objem (μl)	koncentrace
reakční voda	4	-
sekvenační kit	4	-
DMSO	0,5	-
primer	0,5	10 pmol / μl
templátová DNA	0,3 - 2 *	-

Tabulka 11: Poměr jednotlivých složek směsi pro sekvenační reakci v 10 μl.

* Objem templátové DNA byl určen podle množství produktu po PCR reakci nebo po HRM reakci.

Sekvenační kit BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit byl od firmy Applied Biosystems, USA. DMSO pocházelo od společnosti MP Biomedicals, USA. Voda byla použita od firmy Roche Diagnostics GmbH, Německo.

Sekvenační reakce probíhá ve 4 hlavních částech – počáteční denaturace, vlastní cykly reakce a závěrečná elongace, po níž následuje konečné chlazení. Ve druhé části probíhá fáze denaturace, nasedání primerů a syntéza templátové DNA. Každý krok probíhá při odlišné teplotě a v různém počtu cyklů. Následující Tabulka 12 zobrazuje podmínky sekvenační reakce. Reakce probíhaly v termocycleru MY CYCLER verze 1.065 od firmy Bio Rad Laboratories Inc., USA. Po sekvenační reakci následuje čištění vzorku etanolovým typem s acetátem nebo pomocí kolonek a vlastní sekvenace (dělení fragmentů DNA dle velikosti a jejich detekce), která probíhala na přístroji Genetic Analyzer 3130 od společnosti Applied Biosystems, USA.

číslo cyklu	počet opakování	teplota (°C)	čas
1	1	96	3 min
2a	25	96	20 s
2b	25	50	10 s
2c	25	60	4 min
3	1	60	1 min
4	1	4	nekonečno

Tabulka 12: Charakteristika jednotlivých kroků sekvenační reakce.

4.6 ETANOLOVÉ ČIŠTĚNÍ PO SEKVENAČNÍ REAKCI

Tento typ čištění byl použit k přečištění některých vzorků po sekvenační reakci, následně probíhala vlastní sekvenace. Čištění probíhalo podle následujícího postupu.

1. na 10 µl produktu je třeba před použitím připravit směs 1 µl NaOAc (3 M) a 25 µl EtOH (96 %), směs napipetovat do plastové zkumavky s produktem a nechat 10 - 15 min. stát při laboratorní teplotě
2. centrifugovat při 14 500 rpm po dobu 30 min.
3. odstříknout do buničité vaty EtOH
4. přidat 120 µl EtOH (70 %), promíchat a centrifugovat při 14 500 rpm po dobu 10 min.
5. odstříknout do buničité vaty EtOH
6. opakovat bod 4 a 5
7. dokonale odstříknout EtOH do buničité vaty a vysušit při 40 °C po dobu 10 min.
8. přidat 30 µl formamidu a denaturovat při 95 °C po dobu 5 min.
9. do vlastní sekvenace uchovávat vzorky v mrazáku

EtOH (96 %) pocházel od firmy P-LAB a.s., ČR. EtOH (70 %) byl ředěn z EtOH (96 %) v poměru 36,5 ml EtOH (96 %) : 13,5 ml vody pocházející od firmy Fresenius Kabi Italia S.r.l., Itálie. Při objemu 5 µl bylo použito poloviční množství chemikálií.

4.7 KOLONKOVÉ ČIŠTĚNÍ PO SEKVENAČNÍ REAKCI

K čištění byl použit DyeEx 2.0 Spin Kit od společnosti Qiagen, Německo. Tento typ čištění byl použit k přečištění některých vzorků po sekvenační reakci, následně probíhala vlastní sekvenace. Čištění probíhalo podle následujícího postupu.

1. proklepat vrchní část, uvolnit a zavřít víčko, odlomit spodek a vložit do spodní části kolonky
2. centrifugovat při 3 000 rpm po dobu 3 min.
3. vrchní část vložit do plastové zkumavky a spodní část vyhodit
4. vzorek přepipetovat na fritu vrchní části
5. centrifugovat při 3 000 rpm po dobu 3 min.
6. vysušit při 90 °C po dobu 20 min.
7. přidat 30 µl formamidu a denaturovat při 98 °C po dobu 3 min.
8. do vlastní sekvenace uchovávat vzorky v mrazáku

4.8 POUŽITÉ PROGRAMY A DATABÁZE

V diplomové práci byly použity následující programy a databáze. Všechny uvedené záměny a změny v genu *ACTN4* oproti referenční sekvenci jsou uvedeny podle nomenklatury HGV, Human Genome Variation Society, verze v2.0.

I. programy

1. Primer-Blast pro navržení primerů (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome)
2. BioEdit pro porovnání aminokyselinových sekvencí proteinu α -aktinin 4 u různých živočišných druhů a nukleotidových sekvencí genu *ACTN4* u analyzovaných osob (www.mbiolcsu.edu/BioEdit)
3. Protein BLAST 2.2.25+ pro vyhledávání sekvencí proteinů u různých živočišných druhů (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>)
4. Nucleotide Blast pro vyhledávání nukleotidových sekvencí (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>)

II. databáze

1. Biobase, Biological Databases (www.biobase-international.com)
2. NCBI, National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov)

5 VÝSLEDKY

V rámci diplomové práce byla provedena mutační analýza genu *ACTN4* pomocí HRM metody. Následující kapitoly 5.1 – 5.4 zobrazují výsledky analýzy.

5.1 NALEZENÉ POPSANÉ EXONOVÉ JEDNOBODOVÉ POLYMORFIZMY V GENU *ACTN4*

Během mutační analýzy genu *ACTN4* byly pomocí HRM analýzy ve skupině 48 pacientů s nefrotickým syndromem nalezeny již popsané exonové SNPs, které zobrazuje následující Tabulka 13 a obrázky Obr. 20 - 28.

exon	pozice NT: c.NM_004924.3	pozice AK	pacient	reference
5	c.537G>A ¹	p.Pro179	1, 2, 13, 32	*
5	c.546C>T ²	p.Asn182	1, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 21, 27, 31, 35, 45	*
11	c.1279G>A ³	p.Ala427Thr	38	Weins <i>et al.</i> 2005
16	c.1977T>C ⁴	p.Asn659	6, 28, 30, 32, 37, 41	*

Tabulka 13: Nalezené již popsané exonové SNPs v souboru 48 pacientů s NS.

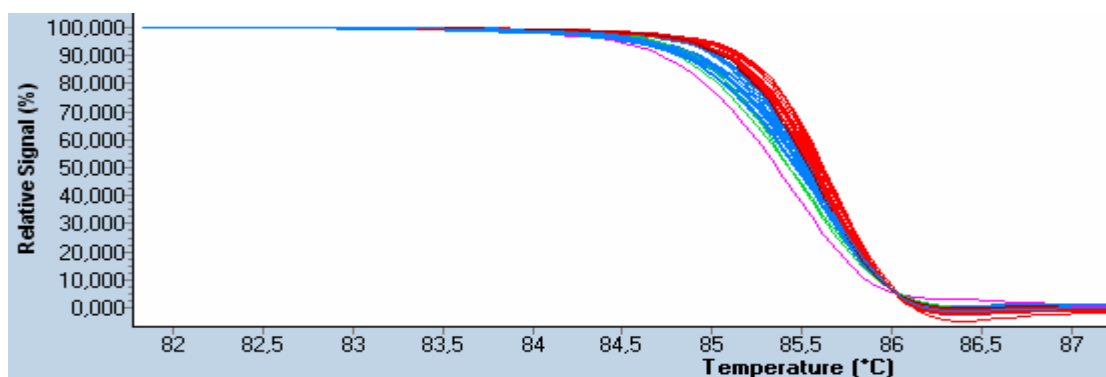
* www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_reg.cgi?locusId=81

¹ viz Obr. 20 – 22

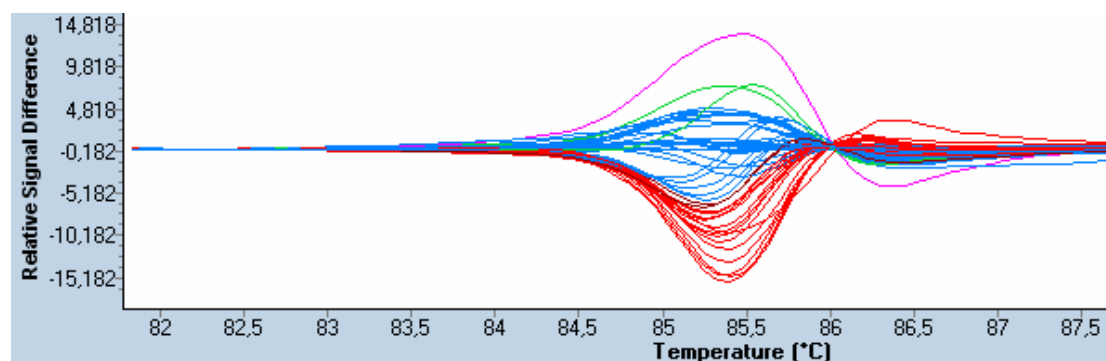
² viz Obr. 20, 21, 23

³ viz Obr. 24, 25, 43, 44

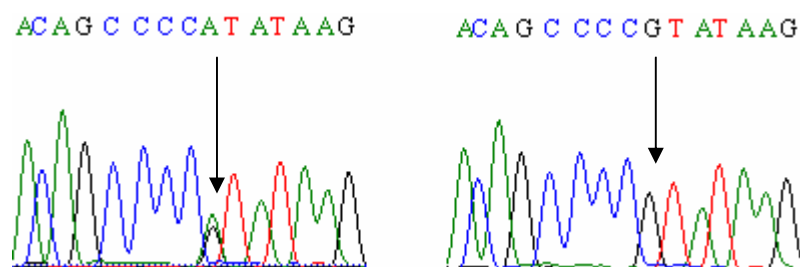
⁴ viz Obr. 26 – 28



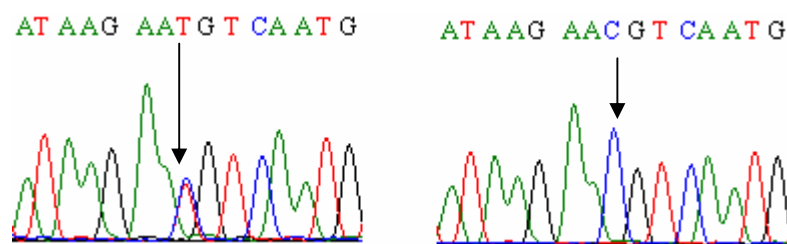
Obr. 20: Výsledek HRM analýzy křivek tání pacientů s nefrotickým syndromem pro exon 5 genu *ACTN4*. Modré křivky zobrazují DNA bez změn, v DNA u křivek s odlišnými barvami byly detekovány změny c.537G>A a c.546C>T oproti referenční sekvenci. Osa x zobrazuje teplotu v °C a osa y úroveň fluorescence v procentech.



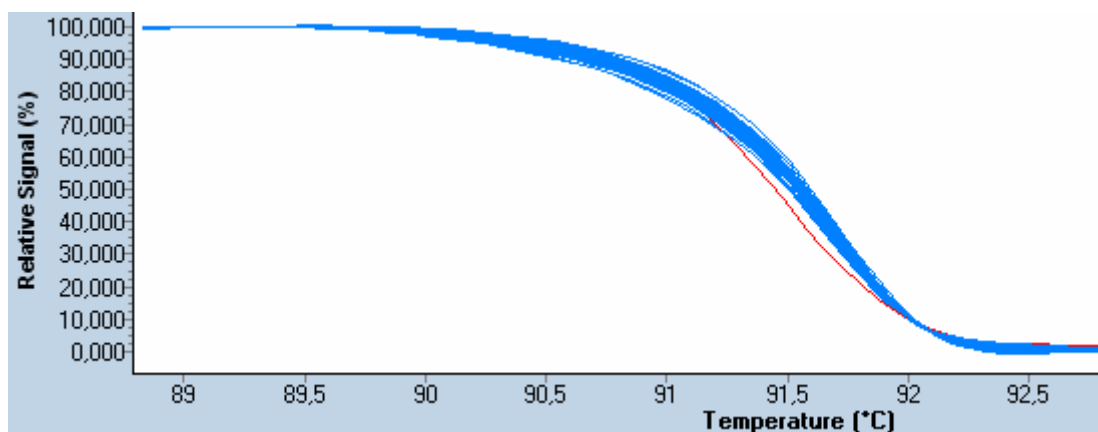
Obr. 21: Zobrazení křivek tání dsDNA pacientů s nefrotickým syndromem pro exon 5 genu *ACTN4* na základě rozdílů jejich fluorescenčního signálu. Modré křivky zobrazují DNA bez změn, v DNA u křivek s odlišnými barvami byly detekovány změny c.537G>A a c.546C>T oproti referenční sekvenci.



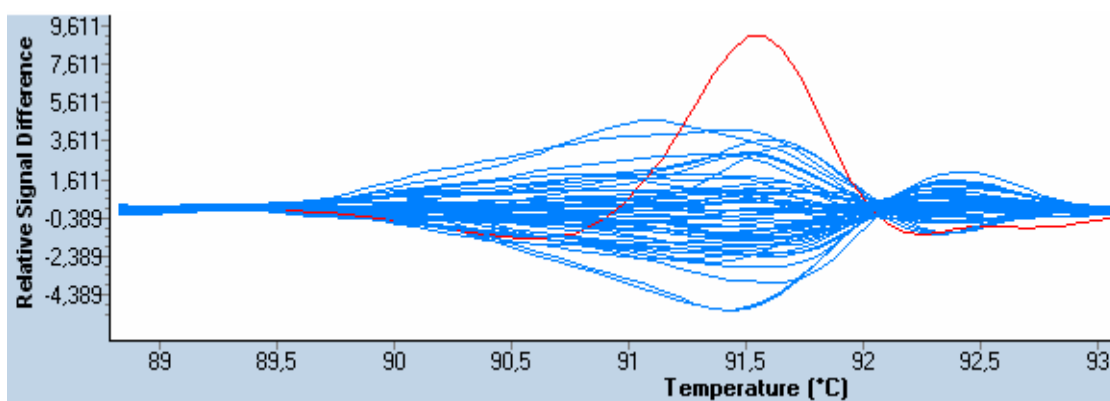
Obr. 22: Obrázek vlevo zobrazuje výsledek sekvenace záměny c.537G>A v exonu 5 genu *ACTN4*, vpravo je sekvenace pacienta bez záměny.



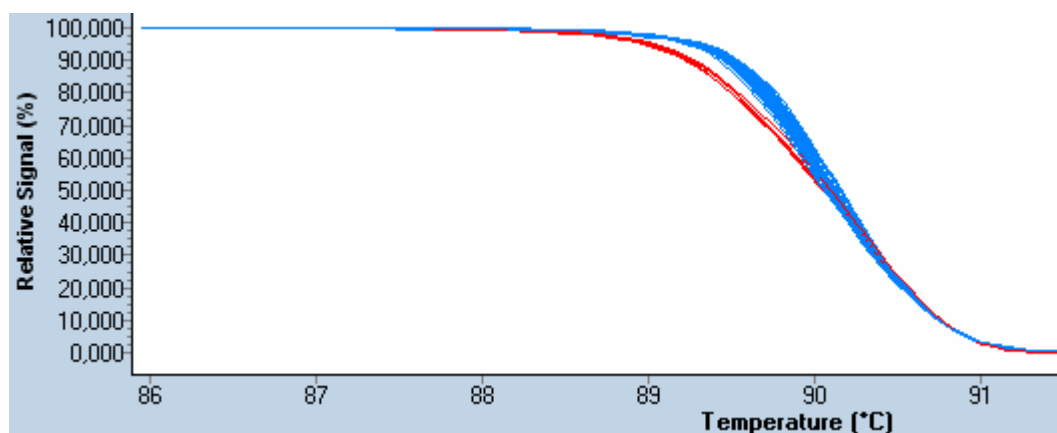
Obr. 23: Obrázek vlevo zobrazuje výsledek sekvenace záměny c.546C>T v exonu 5 genu *ACTN4*, vpravo je sekvenace pacienta bez záměny.



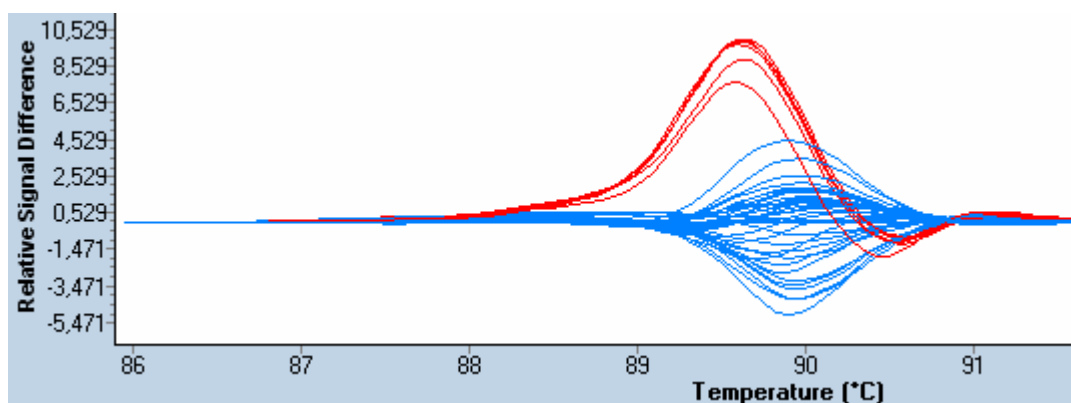
Obr. 24: Výsledek HRM analýzy křivek tání pacientů s nefrotickým syndromem pro exon 11 genu *ACTN4*. Modré křivky zobrazují DNA bez změn, v DNA u červené křivky byla detekována změna c.1279G>A oproti referenční sekvenci.



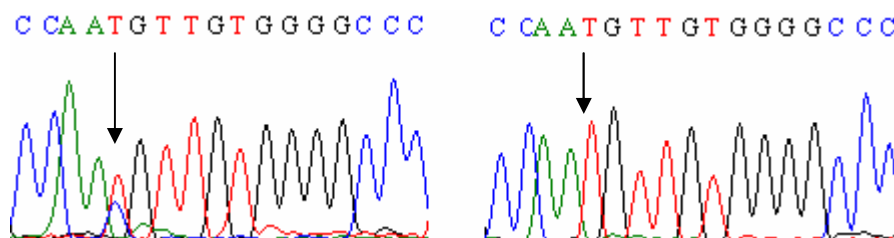
Obr. 25: Zobrazení křivek tání dsDNA pacientů s nefrotickým syndromem pro exon 11 genu *ACTN4* na základě rozdílů jejich fluorescenčního signálu. Modré křivky zobrazují DNA bez změn, v DNA u červené křivky byla detekována změna c.1279G>A oproti referenční sekvenci.



Obr. 26: Výsledek HRM analýzy křivek tání pacientů s nefrotickým syndromem pro exon 16 genu *ACTN4*. Modré křivky zobrazují DNA bez změn, v DNA u červené křivky byla detekována změna c.1977T>C oproti referenční sekvenci.



Obr. 27: Zobrazení křivek tání dsDNA pacientů s nefrotickým syndromem pro exon 16 genu *ACTN4* na základě rozdílů jejich fluorescenčního signálu. Modré křivky zobrazují DNA bez změn, v DNA u červené křivky byla detekována změna c.1977T>C oproti referenční sekvenci.



Obr. 28: Obrázek vlevo zobrazuje výsledek sekvenace záměny c.1977T>C v exonu 16 genu *ACTN4*, vpravo je sekvenace pacienta bez záměny.

5.2 NALEZENÉ INTRONOVÉ JEDNOBODOVÉ POLYMORFIZMY V GENU *ACTN4*

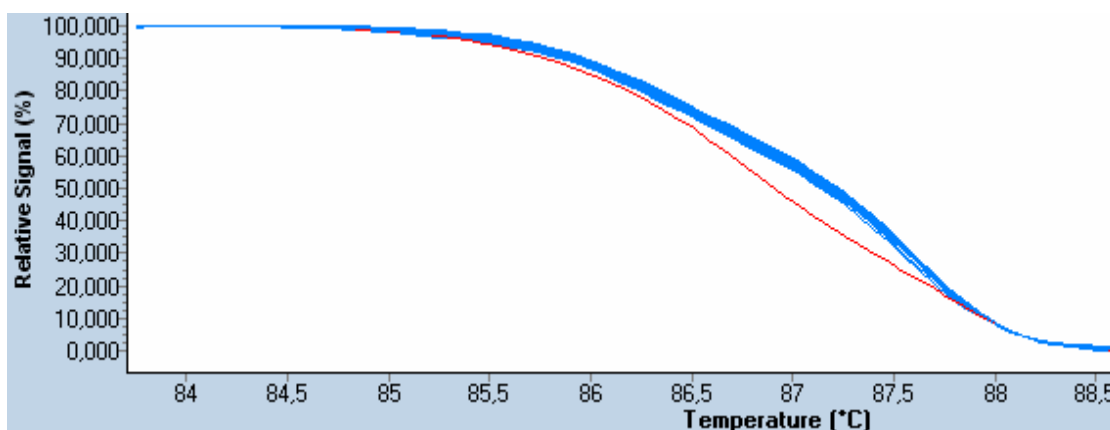
Při mutační analýze genu *ACTN4* byly rovněž identifikovány jednobodové záměny v intronech, které zobrazuje Tabulka 14 a obrázky Obr. 29 - 33. U těchto SNPs nebylo dohledáváno, zda jsou již popsány.

intron	pozice NT: c.NM_004924.3	pacient
IVS3	c.397+27T>A ¹	24
IVS6	c.573-52G>C	50
IVS8	c.819+50G>A	27
IVS8	c.819+26G>T	28
IVS9	c.912+65C>A	49
IVS13	c.1551+49C>T ²	6, 28, 30, 32, 37, 41
IVS15	c.1875+22G>A	24
IVS15	c.1875+23G>A	5, 50
IVS15	c.1875+28G>A	9, 18, 21, 24, 48, 50
IVS15	c.1875+29G>A	1

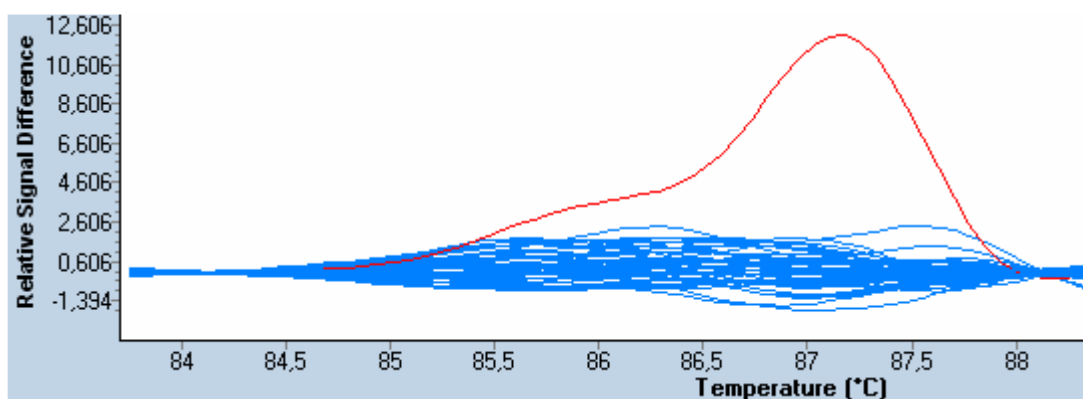
Tabulka 14: Nalezené intronové SNPs.

¹ viz Obr. 29, 30

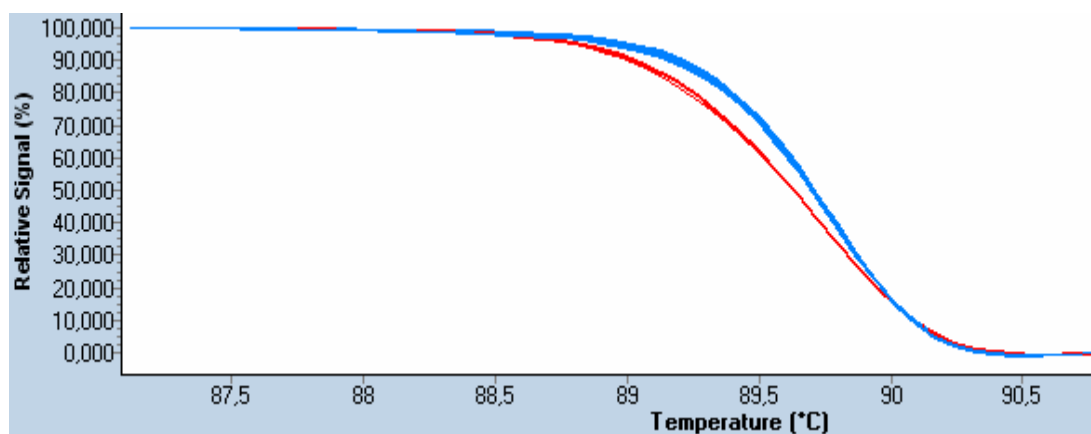
² viz Obr. 31 – 33



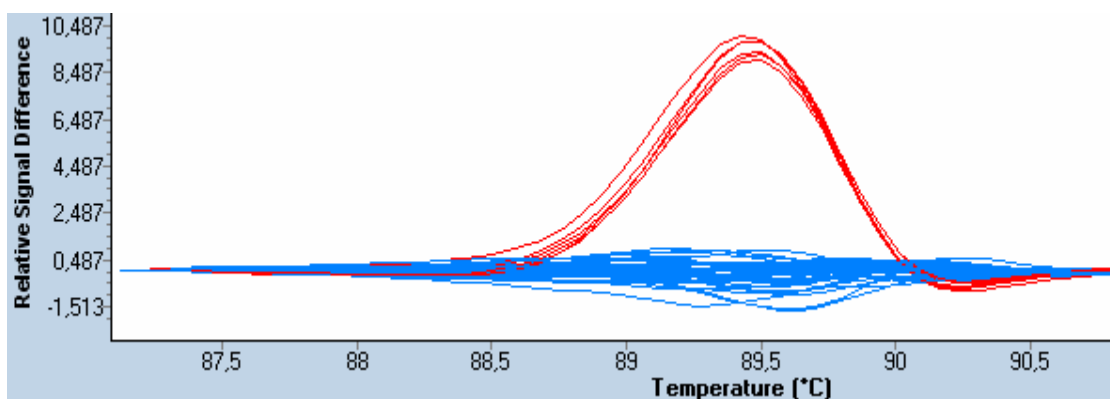
Obr. 29: Výsledek HRM analýzy křivek tání pacientů s nefrotickým syndromem pro IVS3 genu *ACTN4*. Modré křivky zobrazují DNA bez změn, v DNA u červené křivky byla detekována c.397+27T>A změna oproti referenční sekvenci.



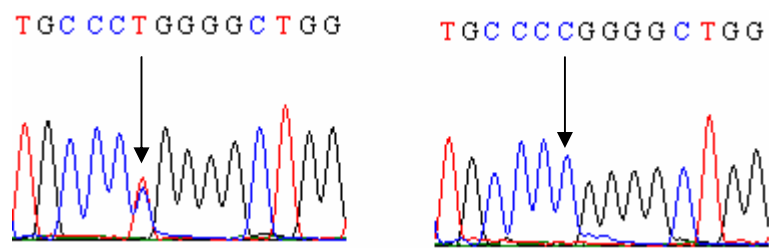
Obr. 30: Zobrazení křivek tání dsDNA pacientů s nefrotickým syndromem pro IVS3 genu *ACTN4* na základě rozdílů jejich fluorescenčního signálu. Modré křivky zobrazují DNA bez změn, v DNA u červené křivky byla detekována c.397+27T>A změna oproti referenční sekvenci.



Obr. 31: Výsledek HRM analýzy křivek tání pacientů s nefrotickým syndromem pro IVS13 genu *ACTN4*. Modré křivky zobrazují DNA bez změn, v DNA u červené křivky byla detekována změna c.1551+49C>T oproti referenční sekvenci.



Obr. 32: Zobrazení křivek tání dsDNA pacientů s nefrotickým syndromem pro IVS13 genu *ACTN4* na základě rozdílů jejich fluorescenčního signálu. Modré křivky zobrazují DNA bez změn, v DNA u červené křivky byla detekována změna c.1551+49C>T oproti referenční sekvenci.



Obr. 33: Obrázek vlevo zobrazuje výsledek sekvenace záměny c.1551+49C>T v IVS13 genu *ACTN4*, vpravo je sekvenace pacienta bez záměny.

5.3 NALEZENÉ NEPOPSANÉ EXONOVÉ JEDNOBODOVÉ POLYMORFIZMY V GENU *ACTN4* NEMĚNÍCÍ AMINOKYSELINOVÉ SLOŽENÍ

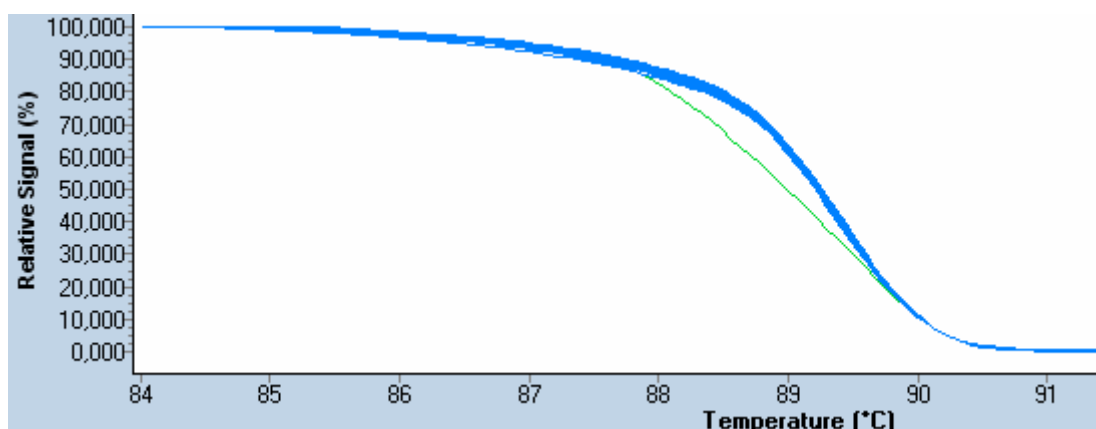
Kromě výše uvedených popsanych exonových SNPs byly nalezeny i 4 nepopsané exonové SNPs, které zobrazuje Tabulka 15 a obrázky Obr. 30 - 36. Tyto záměny však neměnily aminokyselinu v α -aktininu 4.

exon	pozice NT: c.NM_004924.3	pozice AK	pacient
12	c.1425C>T ¹	p.Ala475	41
14	c.1560G>A ²	p.Glu520	36
19	c.2352G>A	p.Ala784	14
19	c.2361C>T	p.Pro787	5

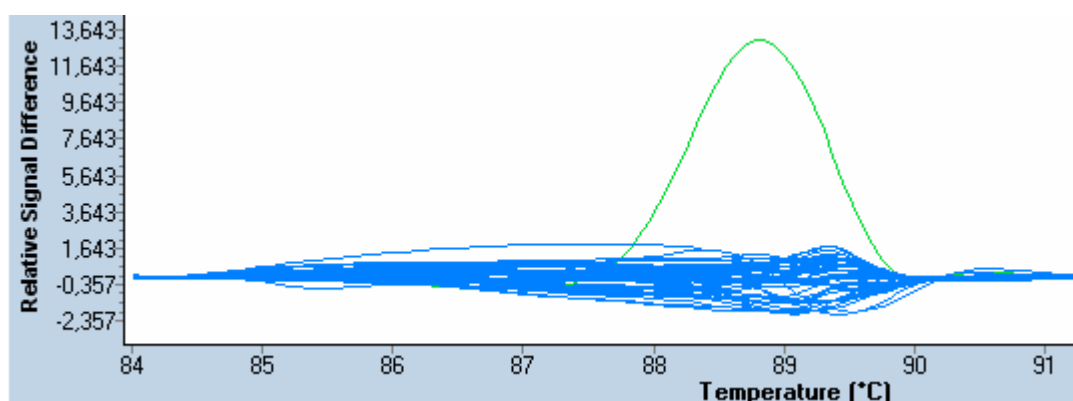
Tabulka 15: Nepopsané exonové SNPs nalezené při mutační analýze genu *ACTN4*.

¹ viz Obr. 34 – 36

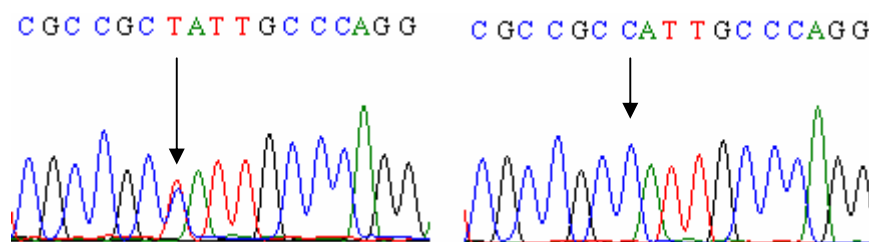
² viz Obr. 45



Obr. 34: Výsledek HRM analýzy křivek tání pacientů s nefrotickým syndromem pro exon 12 genu *ACTN4*. Modré křivky zobrazují DNA bez změn, v DNA u zelené křivky byla detekována změna c.1425C>T oproti referenční sekvenci.



Obr. 35: Zobrazení křivek tání dsDNA pacientů s nefrotickým syndromem pro exon 12 genu *ACTN4* na základě rozdílů jejich fluorescenčního signálu. Modré křivky zobrazují DNA bez změn, v DNA u zelené křivky byla detekována změna c.1425C>T oproti referenční sekvenci.



Obr. 36: Obrázek vlevo zobrazuje výsledek sekvenace záměny c.1425C>T v exonu 12 genu *ACTN4*, vpravo je sekvenace pacienta bez záměny.

5.4 NALEZENÉ NEPOPSANÉ EXONOVÉ JEDNOBODOVÉ ZÁMĚNY V GENU *ACTN4* MĚNÍCÍ AMINOKYSELINOVÉ SLOŽENÍ

Během analýzy byly objeveny i dva nepopsané exonové SNPs, které měnily aminokyselinu v α -aktininu 4. Tyto jednobodové záměny shrnuje Tabulka 16.

exon	pozice NT: c.NM_004924.3	pozice AK	pacient
18	c.2242A>G ¹	p.Asn748Asp	16
19	c.2359C>T	p.Pro787Ser	*
19	c.2360C>T ²	p.Pro787Leu	2, 3, 4

Tabulka 16: Nepopsané exonové SNPs nalezené při mutační analýze genu *ACTN4*.

* Tato záměna byla nalezena u 7 osob v souboru zdravých kontrol.

¹ viz Obr. 37 – 42

² viz Tabulky 17 a 18

Jednobodová záměna v exonu 19 byla ověřena v souboru 48 kontrolních zdravých osob. Z tohoto počtu mělo uvedený polymorfismus 11 osob a dokonce 7 osob mělo záměnu c.2359C>T, která vede k p.Pro787Ser. Pro záměnu c.2360C>T byl také spočítán chí kvadrát test $\chi^2 = \sum (O - E)^2 / E$ (O = pozorované hodnoty, E = očekávané hodnoty) pro jeden stupeň volnosti. Výsledek chí kvadrát testu zobrazují Tabulky 17 a 18.

	pozorované hodnoty - O		očekávané hodnoty - E		celkem
	je záměna	není záměna	je záměna	není záměna	
pacienti	3	45	7	41	48
kontrolní skupina	11	37	7	41	48
součet	14	82	14	82	96

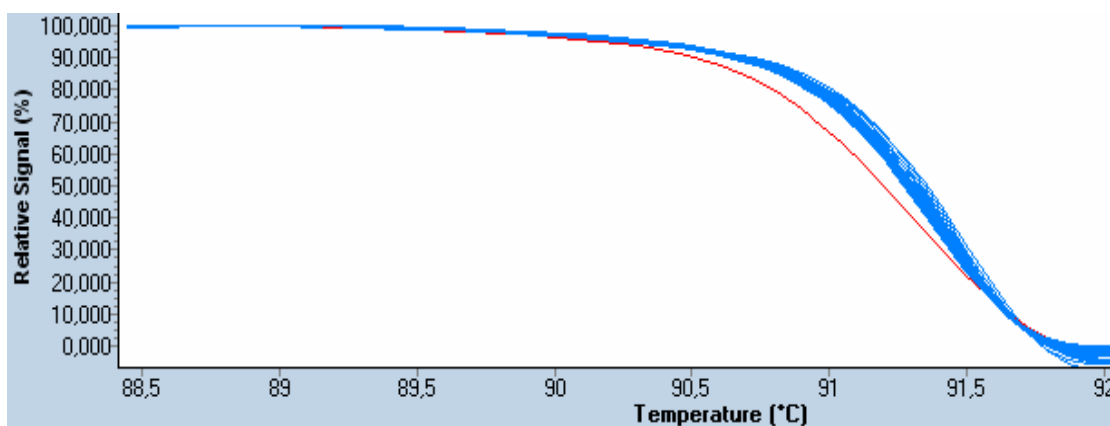
Tabulka 17: Chí kvadrát test pro záměnu c.2360C>T.

	je záměna			není záměna			X ²
	O-E	(O-E) ²	(O-E) ² /E	O-E	(O-E) ²	(O-E) ² /E	
pacienti	-4	16	2,285714	4	16	0,390244	5,351916
kontrolní skupina	4	16	2,285714	-4	16	0,390244	

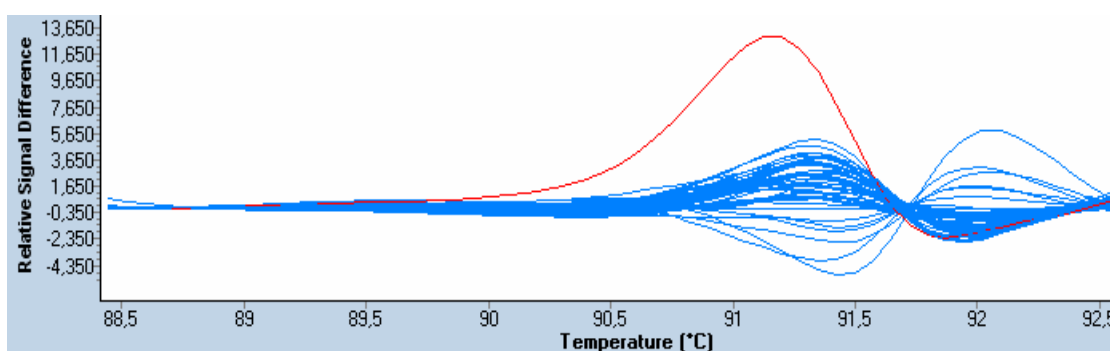
Tabulka 18: Chí kvadrát test pro záměnu c.2360C>T, pokračování Tabulky 20.

Výsledek $\chi^2 = 5,351916$ je vyšší než tabulková hodnota 3,84 pro 5 % hladinu významnosti nižší než tabulková hodnota 6,63 pro 1 % hladinu významnosti pro 1 stupeň volnosti. Uvedený výsledek chí kvadrát testu svědčí o tom, že výskyt polymorfizmu c.2360C>T je pravděpodobnější u zdravých osob než u osob s nefrotickým syndromem. Výskyt změny c.2359C>T, která vedle k p.Pro787Ser, u kontrolních osob nasvědčuje tomu, že daná oblast je variabilní.

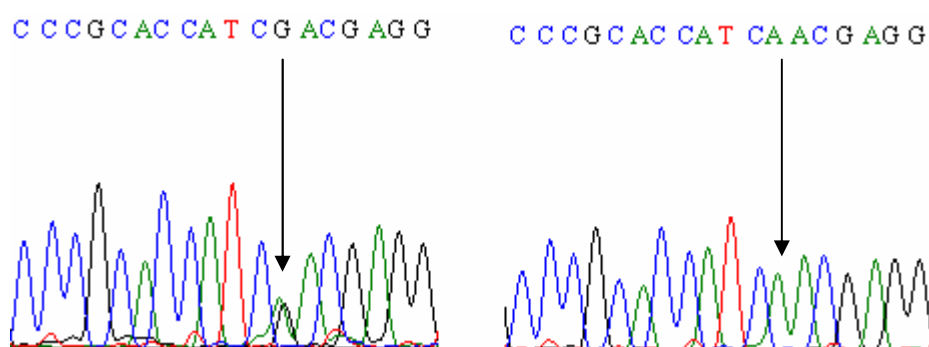
Záměnu pacienta číslo 16 u exonu 18 zobrazují obrázky Obr. 37 - 39. Tato záměna byla také ověřena na kontrolním souboru 50 zdravých osob. Z tohoto počtu neměla žádná osoba ověřovanou záměnu, což zobrazují obrázky Obr. 40 a 41. Vzhledem k výše uvedenému faktu je záměna c.2242A>G v exonu 18 vedoucí k p.Pro787Leu možno považovat za kandidátní mutaci s kauzálním významem. V programu BioEdit bylo také provedeno porovnání konzervovanosti oblasti u různých živočichů (viz Obr. 42), proteinová sekvence u různých živočišných druhů byla hledána pomocí programu Protein Blast.



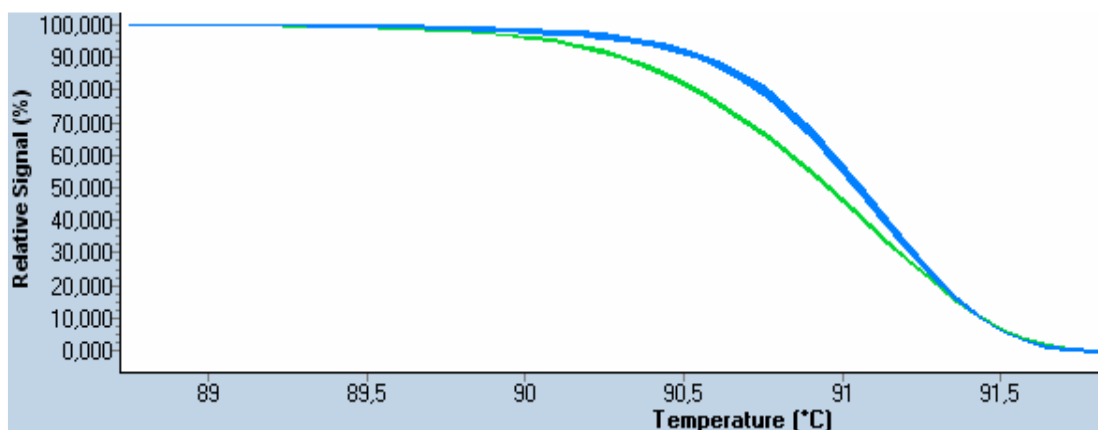
Obr. 37: Výsledek HRM analýzy křivek tání pacientů s nefrotickým syndromem pro exon 18 genu *ACTN4*. Modré křivky zobrazují DNA bez změn, v DNA u červené křivky byla detekována změna c.2242A>G oproti referenční sekvenci.



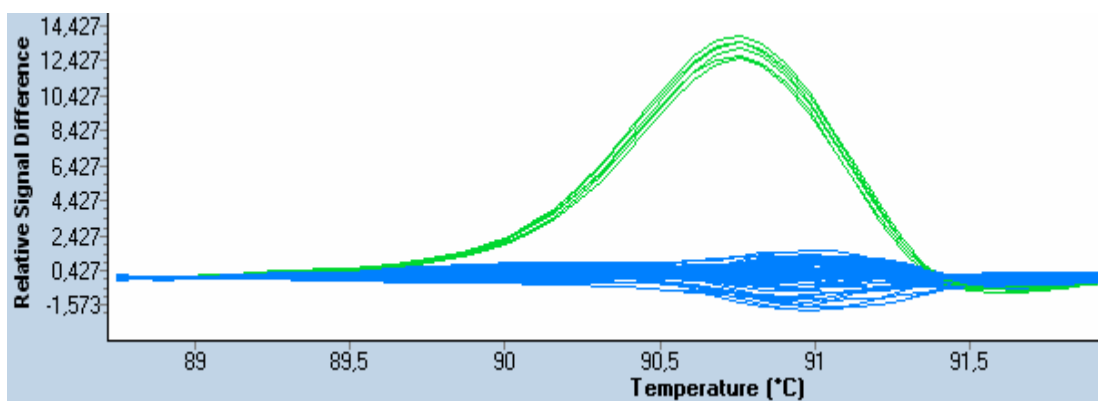
Obr. 38: Zobrazení křivek tání dsDNA pacientů s nefrotickým syndromem pro exon 18 genu *ACTN4* na základě rozdílů jejich fluorescenčního signálu. Modré křivky zobrazují DNA bez změn, v DNA u červené křivky byla detekována změna c.2242A>G oproti referenční sekvenci.



Obr. 39: Obrázek vlevo zobrazuje výsledek sekvenace záměny c.2360C>T v exonu 18 genu *ACTN4*, vpravo je sekvenace pacienta bez záměny.



Obr. 40: Výsledek HRM analýzy křivek tání kontrolních zdravých osob pro exon 18 genu *ACTN4*. Modré křivky zobrazují DNA bez změn, zelené křivky zobrazují pacienta 16 se záměnou c.2242A>G, jehož DNA byla dána do více jamek HRM destičky.



Obr. 41: Zobrazení křivek tání kontrolních zdravých osob pro exon 18 genu *ACTN4* na základě rozdílů jejich fluorescenčního signálu. Modré křivky zobrazují DNA bez změn, zelené křivky zobrazují pacienta 16 se záměnou c.2242A>G, jehož DNA byla dána do více jamek HRM destičky.

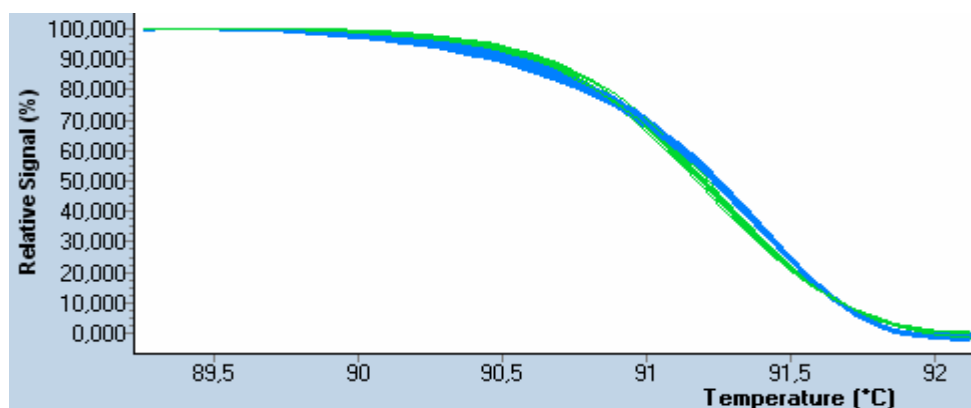
Člověk	WEQLLTTIARTINEVENQILTRDAK
Myš domácí	WEQLLTTIARTINEVENQILTRDAK
Potkan	WEQLLTTIARTINEVENQILTRDAK
Orangutan sumaterský	WEQLLTTIARTINEVENQILTRDAK
Vačice krysí	WEQLLTTIARTINEVENQILTRDAK
Anolis rudokrký	WEQLLTTIARTINEVENQILTRDAK
Gibon bělolící	WEQLLTTIARTINEVENQILTRDAK
Drápatka vodní	WEHLLTTIARTINEVENQILTRDAK
Dánio pruhované	WEQLLTTIARTINEIENQVLTRDAK
Kur bankivský	WEQLLTTIARTINEVENQILTRDAK

Obr. 42: Srovnání konzervovanosti oblasti s nalezenou záměnou p.Asn748Asp (N787D) u různých živočišných druhů. Růžové pole představuje zaměněnou aminokyselinu. Člověk (*Homo sapiens*): ref[NP_004915.2] α -aktinin 4, Myš domácí (*Mus musculus*): ref[NP_068695.1] α -aktinin 4, Potkan (*Rattus norvegicus*): ref[NP_113863.2] α -aktinin 4, Orangutan sumaterský (*Pongo abelii*): ref[NP_001127286.1] α -aktinin 4, Vačice krysí (*Monodelphis domestica*): ref[XP_001362530.1] předpokládaný α -aktinin 4 izoforma 1, Anolis rudokrký (*Anolis carolinensis*): ref[XP_003228576.1] předpokládaný protein podobný α -aktininu 4 izoforma 2, Gibon bělolící (*Nomascus leucogenys*) ref[XP_003252699.1] předpokládaný protein podobný α -aktininu 4 izoforma 2, Drápatka vodní (*Xenopus laevis*): ref[NP_001087030.1] α -aktinin 4, Dánio pruhované (*Danio rerio*): ref[NP_955880.1] α -aktinin 4, Kur bankivský (*Gallus gallus*): ref[NP_990457.1] α -aktinin 4

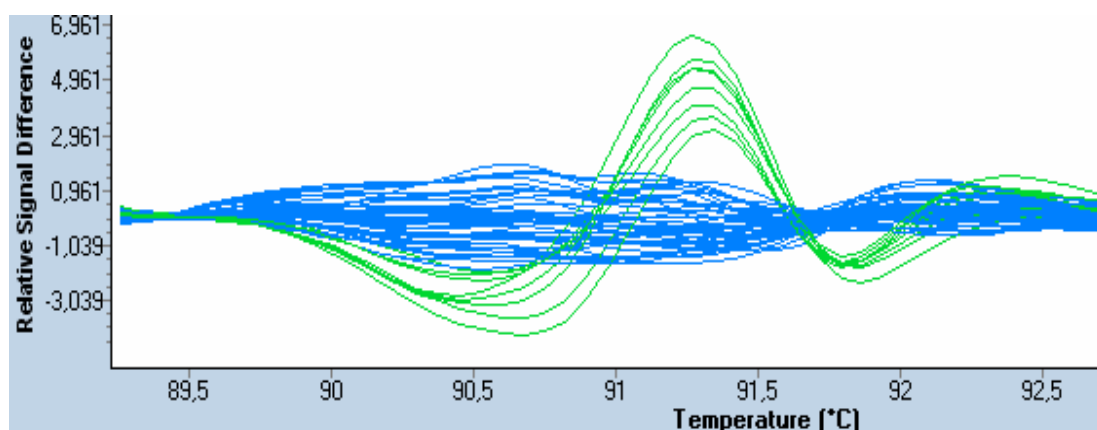
6 DISKUZE

V České republice nebyla do dnešní doby provedena žádná podobná studie zabývající se mutační analýzou genu *ACTN4*, a proto je nutné porovnat výsledky této diplomové práce se zahraničními pracemi. První srovnávanou prací je studie Kaplana a kol., kteří identifikovali 3 jednobodové záměny s předpokládaným patologickým důsledkem. Žádná z těchto mutací nebyla nalezena v souboru vzorků 48 pacientů s nefrotickým syndromem, jejichž DNA byla v rámci diplomové práce analyzována. Kaplan a kol. studovali 2 rodiny, které byly v dřívějších pracích vytipovány jako možní nositelé mutací souvisejících s FSGS, kvůli častému výskytu FSGS v jejich rodokmenech. Své výsledky ověřovali také na kontrolní skupině zdravých osob, která zahrnovala různá etnika. Oproti tomuto, v rámci diplomové práce, byl studován soubor náhodně vybraných pacientů s NS bez příbuzenských vztahů. Z tohoto souboru měli 3 pacienti pozitivní rodinou anamnézu. Následně byly některé nálezy zkoumány a ověřovány na rodinných příslušnících, pokud byly k dispozici vzorky jejich DNA, a na zdravých kontrolách, které poskytly vzorky krve pro izolaci DNA anonymně.

Jako druhou práci je třeba uvést studii Weins a kol, kteří také přispěli do výčtu mutací a SNPs. Jejich skupina popsala mimo jiných i záměnu c.1279C>A v exonu 11 vedoucí k p.Ala427Thr (změna hydrofóbní AK na polární aminokyselinu) jako změnu bez kauzálního významu. Tato záměna se v souboru studovaných českých pacientů objevila u 1 osoby. Následně byla provedena HRM analýza tohoto exonu u 44 zdravých kontrol, aby bylo možno určit četnost výskytu tohoto polymorfizmu u českých pacientů. Avšak u žádné kontroly se zmiňovaný polymorfizmus nevyskytl, jak zobrazují následující obrázky Obr. 43 a 44. Tento jev je možné vysvětlit 2 způsoby. Za prvé, polymorfizmus p.Ala427Thr je vzácný a ověřovaný soubor zdravých kontrol byl příliš malý k jeho zachytu. Za druhé, tento polymorfizmus je kauzální a vede k NS.



Obr. 43: Výsledek HRM analýzy křivek tání kontrolních zdravých osob pro exon 11 genu *ACTN4*. Modré křivky zobrazují DNA bez změn, zelené křivky zobrazují pacienta se záměnou c.1279C>A, jehož DNA byla dána do více jamek HRM destičky.



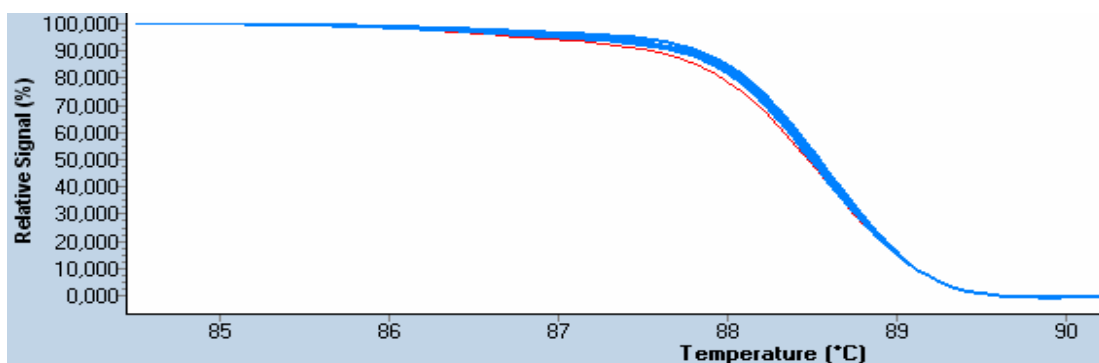
Obr. 44: Zobrazení křivek tání kontrolních zdravých osob pro exon 11 genu *ACTN4* na základě rozdílů jejich fluorescenčního signálu. Modré křivky zobrazují DNA bez změn, zelené křivky zobrazují pacienta se záměnou c.1279C>A, jehož DNA byla dána do více jamek HRM destičky.

Nalezená záměna c.NM_004924.3: 2242A>G, která vede ke změně Asn748Asp (tedy změna polární neutrální AK na kyselou aminokyselinu) v proteinu α -aktinin 4, se z dosud nalezených poznatků a informací jeví jako změna s kauzálním významem. Tento závěr je možno vyvodit z faktu, že záměna se našla u pacientky s nefrotickým syndromem a naopak u žádné zdravé kontrolní osoby. Jak také plyne z obrázku Obr. 42, který porovnává danou oblast u různých živočichů, daná oblast je konzervovaná. Pouze u Dánia pruhovaného (*Danio rerio*) jsou zaměněny aminokyseliny Val a Ile. Vzhledem k tomu, že obě zmíněné AK jsou hydrofóbní a mají podobnou strukturu, je možno předpokládat, že tato záměna nemá žádný vliv na

strukturu a funkci α -aktininu 4. Bylo také zjištěno, že zmiňovaná pacientka má dceru, která trpí fokální segmentální glomerulosklerózou. V budoucnosti by bylo dobré získat vzorek DNA této dcery a zjistit, zda je nositelkou stejné záměny jako matka. Pokud by se toto potvrdilo, bylo by možno záměnu p. Asn748Asp v α -aktininu 4 považovat za kauzální mutaci s prokázanou dědičností.

Bez povšimnutí by rozhodně neměla zůstat skutečnost, že 6 stejných pacientů mělo souběžně záměny v intronu IVS13: c.NM_004924.3: 1551+49C>T a v exonu 16 c.NM_004924.3: 1977T>C, která ovšem nemění aminokyselinové složení proteinu α -aktinin 4 (p.Asn659). Je možno se domnívat, že uvedené záměny mohou být spolu ve vazbě.

Záchyt vzorků se změnou v DNA pomocí HRM analýzy nebyl se 100 % úspěšností. S nízkou frekvencí se vyskytovaly falešně pozitivní i falešně negativní výsledky. Tyto chybné výstupy analýzy se samozřejmě neobjevovaly u každého exonu genu *ACTN4*, ale spíše měly souvislost se situacemi, kdy se daný úsek u konkrétního pacienta amplifikoval s horší účinností. Avšak u některých exonů se falešně pozitivní a negativní vzorky vyskytovaly i po dobré amplifikaci všech vzorků, jak dokládá obrázek Obr. 45. Sám výrobce uvádí, že některé záměny jsou detekovány s horším procentem úspěšnosti. Je tedy pravděpodobné, že všechny záměny a změny v genu *ACTN4* nebyly během HRM analýzy odhaleny.



Obr. 45: Výsledek HRM analýzy křivek tání pacientů s nefrotickým syndromem pro exon 14 genu *ACTN4*. V DNA zobrazenou červenou křivkou nebyla žádná záměna nalezena, avšak v DNA pacienta 36, kterou zobrazuje modrá křivka, byla detekována záměna c.1560G>A oproti referenční sekvenci.

HRM metoda je velice citlivá na počet míst, kde nasedají primery. I když se v některých případech po PCR reakci a následující kontrolní elektroforéze zdálo, že je tvořen pouze jeden produkt, HRM analýza ukázala, že se tvoří více produktů s různými teplotami a křivkami tání. Rovněž je nutné věnovat velkou pozornost podmínkám PCR při HRM analýze. Při hledání optimálních množství reagujících složek, teplot a počtu cyklů se často stávalo, že při určitém poměru jmenovaných parametrů reakce neprobíhala optimálně nebo vůbec. Následně stačilo změnit hodnotu jednoho či více parametrů a PCR běžela s maximální účinností. Samozřejmě se stávalo, že optimální podmínky nebyly nalezeny a pro daný exon genu *ACTN4* musely být vytvořeny nové primery. Na tomto místě je nutné také dodat, že ne všechny vzorky se u každého exonu vždy amplifikovaly během PCR. Daný úsek DNA těchto vzorků byl následně amplifikován pomocí klasické PCR reakce a sekvenován.

7 SOUHRN

Nefrotický syndrom (NS) patří mezi nejčastější a nejzávažnější nefrologické syndromy. Gen *ACTN4* je spojován s idiopatickým nefrotickým syndromem, přičemž se histologicky jedná o MCN nebo o FSGS. V rámci diplomové práce byla provedena mutační analýza genu *ACTN4* na souboru 48 pacientů s nefrotickým syndromem.

Během analýzy genu *ACTN4*, který kóduje protein α -aktinin 4, byly v DNA sekvenci nalezeny již popsané jednobodové záměny, které měnily nebo neměnily aminokyselinu v proteinu α -aktinin 4. Bylo také nalezeno několik intronových záměn a 1 záměna v exonu, která však nemá patologické důsledky, jak bylo zjištěno u zdravých kontrol. Nejdůležitější je však skutečnost, že byla identifikována záměna v exonu 18 c.NM_004924.3: 2242A>G, která vede ke změně Asn748Asp v proteinu α -aktinin 4. Tato záměna se jeví jako kauzální, protože se neobjevila u žádné zdravé kontroly. Tyto zdravé kontroly byly osoby různého pohlaví a věku.

Následující Tabulka 19 přehledně rekapituluje všechny záměny, které byly nalezeny ve zkoumaném souboru pacientů s nefrotickým syndromem.

exon/intron	pozice NT: c.NM_004924.3	pozice AK	pacient	reference
IVS3	c.397+27T>A ¹	-	24	*
5	c.537G>A ²	p.Pro179	1, 2, 13, 32	**
5	c.546C>T ³	p.Asn182	1, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 21, 27, 31, 35, 45	**
IVS6	c.573-52G>C	-	50	*
IVS8	c.819+50G>A	-	27	*
IVS8	c.819+26G>T	-	28	*
IVS9	c.912+65C>A	-	49	*
11	c.1279G>A ⁴	p.Ala427Thr	38	Weins et al. 2005
12	c.1425C>T ⁵	p.Ala475	41	***
IVS13	c.1551+49C>T ⁶	-	6, 28, 30, 32, 37, 41	*
14	c.1560G>A ⁷	p.Glu520	36	***
IVS15	c.1875+22G>A	-	24	*
IVS15	c.1875+23G>A	-	5, 50	*
IVS15	c.1875+28G>A	-	9, 18, 21, 24, 48, 50	*
IVS15	c.1875+29G>A	-	1	*
16	c.1977T>C	p.Asn659	6, 28, 30, 32, 37, 41	**
18	c.2242A>G ⁸	p.Asn748Asp	16	***

exon/intron	pozice NT: c.NM_004924.3	pozice AK	pacient	reference
19	c.2352G>A	p.Ala784	14	***
19	c.2359C>T	p.Pro787Ser	#	***
19	c.2360C>T ⁹	p.Pro787Leu	2, 3, 4	***
19	c.2361C>T	p.Pro787	5	***

Tabulka 19: Rekapitulace všech záměn objevených změn v genu *ACTN4* v analyzovaném souboru pacientů s nefrotickým syndromem.

* Údaje nebyly dohledávány.

** www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_reg.cgi?locusId=81

*** Tyto záměny nebyly nalezeny jako popsané.

Tato záměna byla nalezena u 7 osob v souboru zdravých kontrol.

¹ viz Obr. 29, 30

² viz Obr. 20 – 22

³ viz Obr. 20, 21, 23

⁴ viz Obr. 24, 25, 43, 44

⁵ viz Obr. 34 – 36

⁶ viz Obr. 31 – 33

⁷ viz Obr. 45

⁸ viz Obr. 37 – 42

⁹ viz Tabulky 17 a 18

V rámci řešení diplomového projektu se podařilo vytvořit přímý i zpětný primer pro každý z 21 exonů genu *ACTN4*, které je možno použít pro HRM analýzu a sekvenaci tohoto genu. Současně byly nalezeny vhodné podmínky HRM analýzy pro každý exon genu *ACTN4*. V souboru 48 pacientů s idiopatickým nefrotickým syndromem byla v genu *ACTN4* nalezena 1 kandidátní kauzální mutace způsobující nefrotický syndrom resp. fokální segmentální glomerulosklerózu. Z tohoto vyplývá, že mutace v genu *ACTN4* nejsou častou příčinou nefrotického syndromu.

8 SEZNAM LITERATURY

Addario, B. (2011): Alpha-actinin – an amazing journey through time and species. VMV KBC, Umeå university, Umea, Sweden, 18

Asano, T., Niimura, F., Pastan, I., Fogoll, A.B, Ichikawa, I., Matsusaka, T. (2005): Permanent genetic tagging of podocytes: Fate of injured podocytes in a mouse model of glomerular sclerosis. *J Am Soc Nephrol* 16: 2257 – 2262

Asanuma, K., Kim, K., Oh, J., Giardino, L., Chabanis, S., Faul, C. Reiser, J., Mundel, P. (2005): Synaptopodin regulates the actin-bundling activity of α -actinin in an isoform-specific manner. *The Journal of Clinical Investigation* 115: 1188 – 1198

Aucella, F., De Bonis, P., Gatta, G., Muscarella, L.A., Vigilante, M., di Giorgio, G., D'Errico, M., Zelante, L., Stallone, C., Bisceglia, L. (2005): Molecular analysis of *NPHS2* and *ACTN4* genes in a series of 33 Italian patients affected by adult-onset nonfamilial focal segmental glomerulosclerosis. *Nephron Clin Pract* 99: c31 – c36

Bariety, J., Mandet, Ch., Hill, G.S., Bruneval, P. (2006): Parietal podocytes in normal human glomeruli. *J Am Soc Nephrol* 17: 2770 – 2780

Baron, M.D., Davison, M.D., Jones, P., Critchley, D.R. (1987): The sequence of chick alpha-actinin reveals homologies to spectrin and calmodulin. *The Journal of Biological Chemistry* 262: 17623 – 17629

Beggs, A.H., Byers, T.J., Knoll, J.H.M., Boyce, F.M., Bruns, G.A.P., Kunkel, L.M. (1992): Cloning and characterization of two human skeletal muscle alpha-actinin genes located on chromosomes 1 and 11. *The Journal of Biological Chemistry* 267: 9281 – 9288

Belkin, A.M., Koteliansky, V.E. (1987): Interaction of iodinated vinculin, metavinculin and α -actinin with cytoskeletal proteins. *FEBS letters* 220: 291 – 294

Boute, N., Gribouval, O., Roselli, S., Benessy, F., Lee, H., Fuchshuber, A., Dahan, K., Gubler, M.-C., Niaudet P., Antignac, C. (2000): *NPHS2*, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome. *Nature Genetics* 24: 349 – 354

Boyer, O., Benoit, G., Gribouval, O., Nevo, F., Tête, M.-J., Dantal, J., Gilbert-Dussadier, B., Touchard, G., Karras, A., Presne, C., Grunfeld, J.-P., Legendre, C., Joly, D., Rieu, P., Mohsin, N., Hannedouche, T., Moal, V., Gubler, M.-C., Broutin, I., Mollet, G., Antignac, C. (2011): Mutations in *INF2* are a major cause of autosomal dominant focal segmental glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol* 22: 239 – 245

Brown, E.J., Schlöndorff, J.S., Becker, D.J., Tsukaguchi, H., Tonna, S.J., Uscinski, A.L., Higgs, H.N., Henderson, J.M., Pollak, M.R. (2010): Mutations in the formin gene *INF2* cause focal segmental glomerulosclerosis. *Nature Genetics* 42: 72 – 76

Burridge, K., Feramisco, J.R. (1981): Non-muscle alpha-actinins are calcium-sensitive actin-binding proteins: *Nature* 294: 565 – 567

Byers, T.J., Husain-Chishti, A., Dubreuil, R.R., Branton, D., Goldstein, L., S.B. (1989): Sequence similarity of the amino-terminal domain of *Drosophila* beta spectrin to alpha actinin and dystrophin. *The Journal of Cell Biology* 109: 1633 – 1641

Chen, V.C., Li, X., Perreault, H., Nagy, J.I. (2006): Interaction of zonula occludens-1 (ZO-1) with α -actinin-4: Application of functional proteomics for identification of PDZ domain-associated proteins. *Journal of Proteome Research* 5: 2123 – 2134

Choi, H.J., Lee, B.H., Cho, H.Y., Moon, K.C., Ha, I.S., Nagata, M., Choi, Y., Cheong, H.I. (2008): Familial focal segmental glomerulosclerosis associated with an *ACTN4* mutation and paternal germline mosaicism. *American Journal of Kidney Diseases* 51: 834 – 838

Corgan, A.M., Singleton, C.A., Santoso, C.B., Greenwood, J.A. (2004): Phosphoinositides differentially regulate α -actinin flexibility and function. *Biochem. J.* 378: 1067 – 1072

D'Agati, V. (1994): The many masks of focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney International* 46: 1223 – 1241

D'Agati, V. (2003): Pathologic classification of focal segmental glomerulosclerosis. *Seminars in Nephrology* 23: 117 – 134

D'Agati, V.D., Fogo, A.B., Bruijn, J.A., Jennette J. C. (2004): Pathologic classification of focal segmental glomerulosclerosis: A working proposal. *American Journal of Kidney Diseases* 43: 368 – 382

Dai, S., Wang, Z., Pan, X., Chen, X., Wang, W., Ren, H., Feng, Q., He, J.C., Han, B., Chen, N. (2009): *ACTN4* gene mutations and single nucleotide polymorphisms in idiopathic focal segmental glomerulosclerosis. *Nephron Clin Pract* 111: c87 – c94

Dai, S., Wang, Z., Pan, X., Wang, W., Chen, X., Ren, H., Hao, C., Han, B., Chen, N., (2010): Functional analysis of promoter mutations in the *ACTN4* and *SYNPO* genes in focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transplant* 25: 824 – 835

Daniliuc, S., Bitterman, H., Rahat, M.A., Kinary, A., Rosenzweig, D., Nitza, L. (2003): Hypoxia inactivates inducible nitric oxide synthase in mouse macrophages by disrupting its interaction with α -actinin 4. *The Journal of Immunology* 171: 3225 – 3232

Davison, M.D., Baron, M.D., Critchley, D.R., Wootton, J.C. (1989): Structural analysis of homologous repeated domains in α -actinin and spectrin. *International Journal of Biological Macromolecules* 11: 81 – 90

Deen, W.M. (2004): What determines glomerular capillary permeability? *The Journal of Clinical Investigation* 114: 1412 – 1414

Deegens, J.K.J., Dijkman, H.B.P.M., Borm, G.F. Steenbergen, E.J., van den Berg, J.G., Weening, J.J., Wetzels, J.F.M. (2008): Podocyte foot process effacement as a diagnostic tool in focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney International* 74: 1568 – 1576

Dijkman, H., Smeets, B., van der Laak, J., Steenbergen, E., Wetzels, J. (2005): The parietal epithelial cell is crucially involved in human idiopathic focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney International* 68: 1562 – 1572

Echchakir, H., Mami-Chouaib, F., Vergnon, I., Baurain, J.-F., Karanikas, V., Chouaib, S., Coulie, P.G. (2001): A point mutation in the α -actinin-4 gene generates an antigenic peptide recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on a human lung carcinoma. *Cancer Research* 61: 4078 – 4083

Egido, J. (1996): Vasoactive hormones and renal sclerosis. *Kidney International* 49: 578 – 597

El-Husseini, A.E.-D., Kwasnicka, D., Yamada, T., Hirohashi, S., Vincent, S.R. (2000): BERP, a novel ring finger protein, binds to α -actinin-4. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 267: 906 – 911

Foster, L.J., Rudich, A., Talior, I., Patel, N., Huang, X., Furtado, L.M., Bilan, P.J., Mann, M., Klip, A. (2006): Insulin-dependent interactions of proteins with GLUT4 revealed through stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC). *Journal of Proteome Research* 5: 64 – 75

Fraley, T.S., Pereira, C.B., Tran, T.C., Singleton, C.A., Greenwood, J.A. (2005): Phosphoinositide binding regulates α -actinin dynamics, mechanism for modulating cytoskeletal remodeling. *The Journal of Biological Chemistry* 280: 15479 – 15482

Fraley, T.S., Tran, T.C., Corgan, A.M., Nash, C.A., Hao, J., Critchley, D.R., Greenwood, J.A. (2003): Phosphoinositide binding inhibits α -actinin bundling activity. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 278, No. 26: 24039 – 24045

Fukami, K., Sawada, N., Endo, T., Takenawa, T. (1996): Identification of a Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-binding site in chicken skeletal muscle α -actinin. *The Journal of Biological Chemistry* 271: 2646 – 2650

Geier, P. (2001): Nefrotický syndrom. *Pediatric pro praxi* 3: 120 – 123

Gigante, M., Pontrelli, P., Montemurno, E., Roca, L., Aucella, F., Penza, R., Caridi, G., Ranieri, E., Ghiggeri, G.M., Gesualdo, L. (2009): *CD2AP* mutations are associated with sporadic nephrotic syndrome and focal segmental glomerulosclerosis (FSGS). *Nephrol Dial Transplant* 24: 1858 – 1864

Gonzalez, A.M., Otey, C., Edlund, M., Jones, J.C.R. (2001): Interactions of a hemidesmosome component and actinin family members. *Journal of Cell Science* 114: 4197 – 4206

Haas, M., Meehan, S.H., Karrison, T.G., Spargo, B.H. (1997): Changing etiologies of unexplained adult nephrotic syndrome: A comparison of renal biopsy findings from 1976-1979 and 1995-1997. *American Journal of Kidney Diseases* 30: 621 – 631

Hinkes, B., Wiggins, R.C., Gbadegesin, R., Vlangos, C.N., Seelow, D., Nürnberg, G., Garg, P., Verma, R., Chaib, H., Hoskins, B.E., Ashraf, S., Becker, C. Hennies, H.C., Goyal, M., Wharram, B.L., Schachter, A.D., Mudumana, S., Drummond, I., Kerjaschki, D., Waldherr, R., Dietrich, A., Ozaltin, F., Bakkaloglu, A., Cleper, R., Basel-Vanagaite, L., Pohl, M., Griebel, M., Tsygin, A.N., Soylu, A., Müller, D., Sorli, C.S., Bunney, T.D., Katan, M, Liu, J., Attanasio, M., O'Toole, J.F., Hasselbacher, K., Mucha, B., Otto, E.A., Airik, R., Kispert, A., Kelley, G.G., Smrcka, A.V., Gudermann, T., Holzman, L.B., Nürnberg, P., Hildebrandt, F. (2006): Positional cloning uncovers mutations in *PLCE1* responsible for a nephrotic syndrome variant that may be reversible. *Nature Genetics* 38: 1397 – 1405

Honda, K., Yamada, T., Endo, R., Ino, Y., Gotoh, M., Tsuda, H., Yamada, Y., Chiba, H., Hirohashi, S. (1998): Actinin-4, a novel actin-bundling protein associated with cell motility and cancer invasion. *The Journal of Cell Biology* 140: 1383 – 1393

Honda, K., Yamada, T., Hayashida, Y., Idogawa, M., Sato, S., Hasegawa, F., Ino, Y., Ono, M., Hirohashi, S. (2005): Actinin-4 increases cell motility and promotes lymph node metastasis of colorectal cancer. *Gastroenterology* 128: 51 - 62

Imamura, M., Endo, T., Kurda, M., Tanaka, T., Masaki, T. (1988): Substructure and higher structure of chicken smooth muscle α -actinin molecule. The Journal of Biological Chemistry 263: 7800 – 7805

Izaguirre, G., Aguirre, L., Hu, Y.-P., Lee, H.Y., Schlaepfer, D.D., Aneskievich, B.J., Haimovich, B. (2001): The cytoskeletal/non-muscle isoform of α -actinin is phosphorylated on its actin-binding domain by the focal adhesion kinase. The Journal of Biological Chemistry 276: 28676 – 28685

Kaplan, J.M., Kim, S.H., North, K.N., Rennke, H., Correia, L.A., Tong, H.-Q., Mathis, B.J., Rodríguez-Pérez, J.-C., Allen, P.G., Beggs, A.H., Pollak, M.R. (2000): Mutations in *ACTN4*, encoding α -actinin-4, cause familial focal segmental glomerulosclerosis. Nature Genetics 24: 251 – 256

Kerjaschki, D. (2001): Caught flat-footed: podocyte damage and the molecular bases of focal glomerulosclerosis. The Journal of Clinical Investigation 108: 1583 – 1587

Kikuchi, S., Honda, K., Tsuda, H., Hiraoka, N., Imoto, I., Kosuge, T., Umaki, T., Onozato, K., Shitashige, M., Yamaguchi, U., Ono, M., Tsuchida, A., Aoki, T., Inazawa, J., Hirohashi, S., Yamada, T. (2008): Expression and gene amplification of actinin-4 invasive ductal carcinoma of the pancreas. Clin Cancer Res 14: 5348 – 5356

Kim, J.H., Lee-Kwon, W., Park, J.B., Ryu, S.H., Yun, C.H.C., Donowitz, M. (2002): Ca^{2+} -dependent inhibition of Na^+ / H^+ Exchanger 3 (NHE3) requires an NHE3-E3KARP- α -actinin-4 complex for oligomerization and endocytosis. The Journal of Biological Chemistry 277: 23714 – 23724

Kos, C.H., Le, T.C., Sinha, S., Henderson, J.M., Kim, S.H., Sugimoto, H., Kalluti, R., Gerszten, R.E., Pollak, M.R. (2003): Mice deficient in α -actinin-4 have severe glomerular disease. The Journal of Clinical Investigation 111: 1683 – 1690

Kriz, W. (1996): Progressive renal failure-inability of podocytes to replicate and the consequences for development of glomerulosclerosis. Nephrol Dial Transplant 11: 1738 – 1742

Kriz, W., Hähnel, B., Rösener, S., Elger, M. (1995): Long-term treatment of rats with FGF-2 results in focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney International* 48: 1435 – 1450

Kriz, W., Hosser, H., Hähnel, B., Simons, J.L., Provoost, A.P. (1998a): Development of vascular pole-associated glomerulosclerosis in the Fawn-Hooded rat. *J Am Soc Nephrol* 9: 381 – 396

Kriz, W., Hosser, H., Hähnel, B., Gretz, N., Provoost, A.P. (1998b): From segmental glomerulosclerosis to total nephron degeneration and interstitial fibrosis: A histopathological study in rat models and human glomerulopathies. *Nephrol Dial Transplan* 13: 2781 – 2798

Kumeta, M., Yoshimura, S.H., Harata, M. Takeyasu, K. (2010): Molecular mechanisms underlying nucleocytoplasmic shuttling of actinin-4. *Journal of Cell Science* 123: 1020 – 1030

Lanzetti, L., Palamidessi, A., Areces, L., Scita, G., Di Fiore, P.P. (2004): Rab5 is a signalling GTPase involved in actin remodelling by receptor tyrosine kinases. *Nature* 429: 309 – 314

Leinweber, B., Tang, J.X., Stafford, W.F., Chalovich, J.M. (1999): Calponin interaction with α -actinin-actin: Evidence for a structural role for calponin. *Biophysical Journal* 77: 3208 – 3217

Magdolen, U., Schroeck, F., Creutzburg, S., Schmitt, M., Magdolen, V. (2004): Non-muscle α -actinin-4 interacts with plasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1). *Biol. Chem.* 385: 801 – 808

Maruyama, K., Ebashi, S. (1965): α -Actinin, a new structural protein from striated muscle. *The Journal of Biochemistry* 58: 13 – 19

- McGregor, A., Blanchard, A.D., Rowe, A.J., Critchley, D.R. (1994): Identification of the vinculin-binding site in the cytoskeletal protein α -actinin. *Biochem J.* 381: 225 – 233
- McKenna, N.M., Wang, Y.-L. (1986): Possible translocation of actin and alpha-actinin along stress fibers. *Experimental Cell Research* 167: 95 – 105
- Michaud, J.-L.R., Chaisson, K.M., Parks, R.J., Kennedy, C.R.J. (2006): FSGS-associated α -actinin-4 (K256E) impairs cytoskeletal dynamics in podocytes. *Kidney International* 70: 1054 – 1061
- Michaud, J.-L.R., Hosseini-Abardeh, M., Farah, K., Kennedy, C.R.J. (2009): Modulating α -actinin-4 dynamics in podocytes. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 66: 166 – 178
- Michaud, J.-L., Lemieux, L.I., Dubé, M., Vanderhyden, B.C., Robertson, S.J., Kennedy, C.R.J. (2003): Focal and segmental glomerulosclerosis in mice with podocyte-specific expression of mutant α -actinin-4. *J Am Soc Nephrol* 14: 1200 – 1211
- Nagata, M., Kriz, W. (1992): Glomerular damage after uninephrectomy in young rats. II. Mechanical stress on podocytes as a pathway to sclerosis. *Kidney International* 42: 148 – 160
- Noegel, A., Witke, W., Schleicher, M. (1987): Calcium-sensitive non-muscle α -actinin contains EF-hand structures and highly conserved regions. *FEBS letters* 221: 391 – 396
- Otey, C.A., Pavalko, F.M., Burridge, K. (1990): An interaction between α -actinin and the β_1 integrin subunit in vitro. *The Journal of Cell Biology* 111: 721 – 729
- Patrie, K.M., Drescher, A.J., Welihinda, A., Mundel, P. (2002): Interaction of two actin-binding proteins, synaptopodin and α -actinin-4 with the tight junction protein MAGI-1. *The Journal of Biological Chemistry* 277: 30183 – 30190

Pavalko, F.M., LaRoche, S.M. (1993): Activation of human neutrophils induces an interaction between the integrin beta 2-subunit (CD 18) and the actin binding protein alpha-actinin. *The Journal of Immunology* 151: 3795 - 3807

Quick, Q., Skalli, O. (2010): α -Actinin 1 and α -actinin 4: Contrasting roles in the survival, motility, and RhoA signaling of astrocytoma cells. *Experimental Cell Research* 316: 1137 – 1147

Reiterová, J., Šafránková H. (2010): Geneticky podmíněné formy nefrotického syndromu. *Aktuality v nefrologii* 16: 96 – 100

Remuzzi, G., Ruggenenti, P., Benigni, A. (1997): Understanding the nature of renal disease progression. *Kidney International* 51: 2 – 15

Ronco, P. (2007): Proteinuria: is it all in the foot? *The Journal of Clinical Investigation* 117: 2079 – 2082

Ruotsalainen, V., Ljungberg, P., Wartiovaara, J., Lenkkeri, U., Kestila, M., Jalanko, H., Holmberg, C., Tryggvason, K. (1999): Nephlin is specifically located at the slit diaphragm of glomerular podocytes. *PNAS* 96: 7962 – 7967

Rychlík, I., Jančová, E., Tesař, V., Kolský, A., Lácha, J., Stejska, J., Stejskalová, A., Dušek, J., Herout, V. (2004): The Czech registry of renal biopsies. Occurrence of renal diseases in the years 1994-2000. *Nephrol Dial Transplant* 19: 3040 – 3049

Ryšavá, R., Tesař, V., Merta, M. (2005): Nefrotický syndrom. *Interní medicína pro praxi* 3: 131 – 134

Sen, S., Dong, M., Kumar, S. (2009): Isoform-specific contributions of α -actinin to glioma cell mechanobiology. *PLoS ONE* 4: e8427

Shao, H., Wang, J.H.-C., Pollak, R., Wells, A. (2010a): α -Actinin-4 is essential for maintaining the spreading, motility and contractility of fibroblasts. *PLoS ONE* 5: e13921

Shao, H., Wu, C., Wells, A. (2010b): Phosphorylation of α -actinin 4 upon epidermal growth factor exposure regulates its interaction with actin. *The Journal of Biological Chemistry* 285: 2591 – 2600

Shibasaki, F., Fukami, K., Fukui, Y., Takenawa, T. (1994): Phosphatidylinositol 3-kinase binds to α -actinin through the p85 subunit. *Biochem J.* 302: 551 - 557

Shih, N.-Y., Li, J., Cotran, R., Mundel, P. Miner, J.H., Shaw A.S. (2001): CD2AP localizes to the slit diaphragm and binds to nephrin via a novel C-terminal domain. *American Journal of Pathology* 159: 2303 – 2308

Shirato, I., Hosser, H., Kimura, K., Sakai, T., Tomino, Y., Kriz, W. (1996): The development of focal segmental glomerulosclerosis in Masugi nephritis is based on progressive podocyte damage. *Virchows Arch* 429: 255 – 273

Smeets, B., Te Loeke, N.A.J.M., Dijkman, H.B.P.M, Steenbergen, M.L.M., Lensen, J.F.M., Begieneman, M.P.V, van Kuppevelt, T.H., Wetzels, J.F.M, Steenbergen, E.J. (2004): The parietal epithelial cell: A key player in the pathogenesis of focal segmental glomerulosclerosis in Thy-1.1 transgenic mice. *J Am Soc Nephrol* 15: 928 – 939

Stokes, M.B., Valeri, A.M., Markowitz, G.S., D'Agati, V.D. (2006): Cellular focal segmental glomerulosclerosis: Clinical and pathologic features. *Kidney International* 70: 1783 – 1792

Tang, W.W., Ulich, T.R., Lacey, D.L., Hill, D.C., Qi, M., Kaufman, S.A., Van, G.Y., Tarpley, J.E., Yee, J.S. (1996): Platelet-derived growth factor-BB induces renal tubulointerstitial myofibroblast formation and tubulointerstitial fibrosis. *American Journal of Pathology* 148: 1169 – 1180

Tesař, V. (2008): Nefrotický syndrom – patogeneze, diagnostika, komplikace, léčba. *Med. Pro Praxi* 5: 62 – 64

Tesař, V., Schück, O., Bartoníčková, K., Čertíková-Chábová, V., Červenka, L., Engliš, M., Honsová, E., Horáčková, M., Jančová, E., Lácha, J., Lukáč, M., Merta, M., Opatrná, S., Opatrný, K., Reiterová, J., Ryšavá, R., Teplan, V., Viklický, O., Vítko, Š. (2006): *Klinická nefrologie*. Grada Publishing a.s., Praha

Vallenius, T., Luukko, K., Mäkelä, T.P. (2000): CLP-36 PDZ-LIM protein associates with nonmuscles α -actinin-1 and α -actinin-4. *The Journal of Biological Chemistry* 275: 11100 – 11105

Walikonis, R.S., Oguni, A., Khorosheva, E.M., Jeng, C.-J., Asuncion, F.J., Kennedy M.B. (2001): Densin-180 forms a ternary complex with the α -subunit of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II and α -actinin. *The Journal of Neuroscience* 21: 423 – 433

Weins, A., Kenlan, P., Herbert, S., Le, T.C., Villegas, I., Kaplan, B.S., Appel, G.B., Pollak, M.R. (2005): Mutational and biological analysis of α -actinin-4 in focal segmental glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol* 16: 3694 – 3701

Weins, A., Schlondorff, J.S., Nakamura, F., Denker, B.M., Hartwig, J.H., Stossel, T.P., Pollak, M.R. (2007): Disease-associated mutant α -actinin-4 reveals a mechanism for regulating its F-actin-binding affinity. *PNAS* 104: 16080 – 16085

Winn, M.P. (2008): 2007 Young Investigator Award: TRP'ing into a new era for glomerular disease. *J Am Soc Nephrol* 19: 1071 – 1075

Winn, M.P., Conlon, P.J., Lynn, K.L., Farrington, M.K., Creazzo, T., Hawkins, A.F., Daskalakis, N., Kwan, S.Y., Ebersviller, S., Burchette J.L., Pericak-Vance, M.A., Howell, D.N., Vance, J.M., Rosenberg, P.B. (2005): A mutation in the *TRPC6* cation channel causes familial focal segmental glomerulosclerosis. *Science* 308: 1801 – 1804

Yamamoto, S., Tsuda, H., Honda, K., Onozato, K., Takano, M., Tamai, S., Imoto, I., Inazawa, J., Yamada, T., Matsubara, O. (2009): Actinin-4 gene amplification in ovarian cancer: A candidate oncogene associated with poor patient prognosis and tumor chemoresistance. *Modern Pathology* 22: 499 – 507

Youssoufian, H., McAfee, M. Kwiatkowski, D.J. (1990): Cloning and chromosomal localization of the human cytoskeletal α -actinin gene reveals linkage to the β -spectrin gene. *Am. J. Hum. Genet.* 47: 62 – 72